UNIVERSITÉ DE BORDEAUX

FACULTÉ DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE

1936-1937. — N° 281

ÉTUDE BIOCHIMIQUE
DE
L'EXCRÉTION ET DE L'INTOXICATION AMMONIACALES
CHEZ LES INVERTÉBRÉS ET QUELQUES POISSONS

(Travail du Laboratoire de Chimie biologique de la Faculté de Médecine et de Pharmacie de Bordeaux et de la Station biologique d'Arcachon)

THÈSE POUR LE DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ
Mention « PHARMACIE »

présentée et soutenue publiquement le mardi 27 juillet 1937

PAR

Blanche-Émilienne SOUTERBICQ, née DÉVÉ

Lauréate de la Faculté de Médecine et de Pharmacie de Bordeaux
(Prix des Travaux pratiques 1928-1929),
Licenciée ès Sciences,
Lauréate de la Faculté des Sciences de Bordeaux
(Prix de la Fondation Prévot 1930-1931),
Assistante du Laboratoire de Chimie biologique de la Faculté de Médecine.

Née à BREST (Finistère), le 17 juin 1908

Examinateurs de la Thèse

MM. CHELLE, professeur ..... *Président.*
LABAT, professeur..... } *Juges.*
R. SIGALAS, professeur ..... } *Juges.*
VITTE, agrégé ..... } *Juges.*

BORDEAUX
IMPRIMERIE-LIBRAIRIE DELMAS
6, Place Saint-Christoly

1937

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546507_0062

UNIVERSITÉ DE BORDEAUX

FACULTÉ DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE

1936-1937. — N° 281

ÉTUDE BIOCHIMIQUE
DE
L'EXCRÉTION ET DE L'INTOXICATION AMMONIACALES
CHEZ LES INVERTÉBRÉS ET QUELQUES POISSONS

(Travail du Laboratoire de Chimie biologique de la Faculté de Médecine et de Pharmacie de Bordeaux et de la Station biologique d'Arcachon)

THÈSE POUR LE DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ
Mention « PHARMACIE »

présentée et soutenue publiquement le mardi 27 juillet 1937

PAR

Blanche-Émilienne SOUTERBICQ, née DÉVÉ

Lauréate de la Faculté de Médecine et de Pharmacie de Bordeaux
(Prix des Travaux pratiques 1928-1929),
Licenciée ès Sciences,
Lauréate de la Faculté des Sciences de Bordeaux
(Prix de la Fondation Prévot 1930-1931),
Assistante du Laboratoire de Chimie biologique de la Faculté de Médecine.

Née à BREST (Finistère), le 17 juin 1908

Examinateurs de la Thèse

MM. CHELLE, professeur ..... *Président.*
LABAT, professeur..... *Juges.*
R. SIGALAS, professeur ..... *Juges.*
VITTE, agrégé ..... *Juges.*

BORDEAUX
IMPRIMERIE-LIBRAIRIE DELMAS
6, Place Saint-Christoly
1937

FACULTÉ DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE DE BORDEAUX

DOYEN : M. MAURIAC.

ASSESSEUR : M. LABAT.

DOYEN HONORAIRE : M. C. SIGALAS.

PROFESSEURS HONORAIRES :

MM. POUSSON, MOURE, RIVIÈRE, BARTHE, DENIGÈS, BEILLE, CASSAËT, CHAVANNAZ, PACHON.

PROFESSEURS :

	MM.		MM.
Clinique médicale	MAURIAC.	Zoologie et parasitologie	MANDOUL.
id.	DUPÉRIÉ.	Médecine expérimentale	AUBERTIN.
Clinique chirurgicale	BÉGOUIN.	Clinique ophtalmologique	TEULIÈRES.
Clinique chirurgicale et gynécologique	GUYOT.	Clinique chirurg. infantile et orthopédie	ROCHER.
Pathologie et thérapeutique générales	CARLES.	Clinique méd. des maladies des enfants	CRUCHET.
Clinique d'accouchements	ANDÉRODIAS.	Chimie biologique et médicale	N.
Anatomie pathol. et microscopie clinique	SABRAZÈS.	Physique médicale et pharmaceutique	C. SIGALAS
Anatomie	VILLEMIN.	Médec. coloniale et clin. des mal. exotiques	BONNIN.
Anatomie générale et histologie	G. DUBREUIL.	Clinique des malad. cutanées et syphilitiques	PETGES.
Hygiène	LEURET.	Clinique des maladies des voies urinaires	DUVERGEY
Médecine légale et déontologie	LANDE.	Clinique des malad. nerveuses et mentales	ABADIE.
Electroradiologie et clin. d'électricité médic.	RÉCHOU.	Clinique d'oto-rhino-laryngologie	PORTMANN.
Chimie	CHELLE.	Toxicologie et hygiène appliquée	LABAT.
Botanique et matière médicale	GOLSE.	Hydrologie thérapeutique et climatologie	CREYX.
Pharmacie	DUPOUY.	Clinique odonto-stomatolo ique	DUBECQ.

MM. LACOSTE (Histologie). PERY (Obstétrique). PERRENS (Maladies mentales). PAPIN (Chirurgie générale). R. SIGALAS (Parasitologie et sciences naturelles). JEANNENEY (Chirurgie générale).

AGRÉGÉS EN EXERCICE :

	MM.		MM.
Anatomie	N.	Chirurgie générale	MASSÉ.
id.	DUFOUR.	id.	DARGET.
Physiologie	FABRE.	Obstétrique	RIVIÈRE.
Médecine générale	PIÉCHAUD.	Ophtalmologie	BEAUVIEUX.
id.	DELMAS-MARSALET.	Oto-rhino-laryngologie	DESPONS.
id.	DE GRAILLY.	Dermatologie et syphiligraphie	JOULIA.
id.	FONTAN.	Physique médicale	WANGERMEZ.
id.	BROUSTET.	Chimie générale pharmaceut. et toxicologie	VITTE
id.	DERVILLÉE.		

COURS COMPLÉMENTAIRES :

	MM.		MM.
Physiologie	FABRE.	Physique médicale et pharmaceut que	WANGERMEZ
Médecine opératoire	PAPIN.	Médecine légale	DERVILLÉE.
Accouchements	RIVIÈRE.	Urologie	DARGET.
Pathologie médicale	DELMAS-MARSALET.	Botanique	GIRARD.
Puériculture	FAUGÈRE.	Bactériologie	MOUREAU.
Pharmacie chimique	VITTE.	Législation pharmaceutique	POPLAWSKI.
Zoologie et parasitologie	R. SIGALAS.		

Ophtalmologie ..... MM. CABANNES (en congé).

Orthopédie chez l'adulte, pour les accidentés du travail, les mutilés de guerre et les infirmes. N.

Le Secrétaire de la Faculté : ROUGERIE.

Par délibération du 5 août 1879, la Faculté a arrêté que les opinions émises dans les Thèses qui lui sont présentées doivent être considérées comme propres à leurs auteurs, et qu'elle entend ne leur donner ni approbation ni improbation.

R. UNIV. BIBLIOTHEEK LEIDEN

A MON MARI

A MES FILS

A LA MEMOIRE

DE MON PERE ET DE MON GRAND-PERE

A MA MERE

A TOUS LES MIENS

A MES AMIS

A MES MAITRES

DE LA FACULTE DE MEDECINE ET DE PHARMACIE

A Monsieur le Professeur R. SIGALAS

Chargé du Cours complémentaire de zoologie et de parasitologie,
Chef des Travaux de zoologie et parasitologie,
Directeur du Laboratoire maritime de l'Ecole des Hautes Etudes de Paris,
Directeur de la Station biologique d'Arcachon,
Chevalier de la Légion d'honneur,
Croix de guerre,
Officier de l'Instruction publique.

A LA MEMOIRE

du Professeur DELAUNAY

Professeur de Chimie biologique et médicale,
Membre correspondant de la Société de Biologie,
Docteur ès Sciences,
Chevalier de la Légion d'honneur,
Croix de guerre,
Officier de l'Instruction publique.

A peine avais-je fini mes études, qu'il me fit l'honneur de m'appeler à ses côtés pour être son assistante. Je n'avais alors qu'une faible idée de la vie de laboratoire et surtout de laboratoire de recherches désintéressées. Mais je compris aussitôt ce qu'était la recherche scientifique, grâce à l'intimité qui liait le Maître à tous ceux qui voulaient apprendre. Il savait nous intéresser à toutes les recherches, car par un mot, une idée, une expérience qu'il faisait lui-même, il laissait entrevoir des conclusions qui, le plus souvent, trouvaient la vérification dans les faits que nous étions amenés à constater.

Après quelques mois de travail sous sa direction, il m'a fait comprendre l'intérêt qu'il y avait à l'étude des Invertébrés et m'a dirigée vers une question qui l'intéressait plus particulièrement, l'ammoniaque chez ces animaux.

C'est à lui, à ses conseils de tous les instants, que je dois d'avoir mené à bonne fin ce travail dont il avait discuté chaque paragraphe, chaque expérience, avant de l'admettre.

C'est au moment où j'arrivais au but qu'il m'avait fixé qu'une maladie affreuse et une mort brutale sont venues l'enlever à l'admiration et à l'affection de ses élèves.

Notre mémoire saura garder un impérissable souvenir de celui qui fut notre maître, maître tout dévoué à la Science et à ses élèves.

A MON PRESIDENT DE THESE

Monsieur le Professeur L. CHELLE

Professeur de Chimie,
Membre correspondant de l'Académie de Médecine,
Chevalier de la Légion d'honneur,
Officier de l'Instruction publique.

Qui a bien voulu accepter la présidence de cette thèse.

ÉTUDE BIOCHIMIQUE

DE

L'EXCRÉTION ET DE L'INTOXICATION AMMONIACALES

CHEZ LES INVERTÉBRÉS ET QUELQUES POISSONS

INTRODUCTION

Parmi les substances qui ont une importance au point de vue vital, il en est une dont l'utilisation par l'organisme sous différentes formes et en de très nombreux composés est considérable. L'azote en effet fait partie intégrante de la cellule vivante, il appartient à la structure de la cellule d'une part, et, d'autre part, il joue un grand rôle dans la vie, la conservation et la mort de la cellule et nous montre ainsi si cette dernière est en état d'équilibre fonctionnel ou en état de déficience.

Ces considérations ont une grande importance chez les êtres supérieurs, mais elles sont encore plus sensibles chez les animaux inférieurs. Mais le métabolisme de l'azote chez les Invertébrés, et en particulier celui de l'ammoniaque, est encore une question incomplètement résolue.

Il est possible que l'ammoniaque et les sels ammoniacaux

peuvent être directement utilisés par l'organisme dans certains cas pour servir d'aliment, comme l'a pensé Bohn en 1899; mais le plus souvent nous pouvons considérer comme déchet l'ammoniaque, l'excrétion azotée basale étant une excrétion ammoniacale que nous retrouvons chez tous les Invertébrés, Vertébrés inférieurs aquatiques et au début de la vie embryonnaire de tous les Vertébrés (H. Delaunay).

Au contraire d'un certain nombre de cellules végétales capables de transformer et d'assimiler directement l'ammoniaque, la cellule animale ne peut vivre et se développer normalement dans un milieu contenant même une très faible concentration en azote ammoniacal, c'est pourquoi la cellule animale cherche par tous les moyens (dialyse, combinaison, synthèse) à l'éliminer, soit qu'il provienne du métabolisme des protides, soit d'une injection directe des sels ammoniacaux.

Ces questions, taux de l'ammoniaque dans le sang et dans le milieu intérieur, et intoxication, furent déjà étudiées, et le Professeur Delaunay, dans son rapport sur le métabolisme de l'ammoniaque d'après les recherches relatives aux Invertébrés, nous a donné une vue d'ensemble des résultats déjà publiés. Il a signalé en particulier que, par suite de la diversité des méthodes utilisées et des techniques employées, les données acquises ne sont pas toujours concordantes. Aussi, sur ses conseils, avons-nous repris la question en nous plaçant dans les mêmes conditions que celles qui ont récemment permis de déterminer avec précision le taux de l'azote ammoniacal dans le sang des Vertébrés.

Parallèlement à ces recherches, nous avons étudié la résistance de ces animaux vis-à-vis de l'ammoniaque et essayé de déterminer d'une façon précise la dose toxique en nous plaçant dans des conditions telles (pH, sel ammoniacal choisi) que seuls les ions ammonium puissent être considérés comme agent toxique.

Notre travail comprendra donc un premier chapitre où nous résumerons les travaux déjà parus au sujet de l'am-

moniaque chez les Invertébrés. Dans le chapitre suivant, nous indiquerons le mode de prélèvement des liquides de l'organisme et nous exposerons la méthode de dosage que nous avons adoptée. Le chapitre III comprendra les résultats que nous avons obtenus avec notre méthode et ceux des différents auteurs qui se sont occupés de cette question. Le chapitre IV est consacré à l'intoxication ammoniacale chez quelques-uns des Invertébrés étudiés précédemment. Enfin, nous avons réservé un chapitre spécial à l'étude du *Protopterus æthiopicus*, poisson du Soudan, que le Gouverneur général a bien voulu nous faire parvenir. Dans le dernier chapitre, nous résumerons nos travaux et nous essayerons d'en dégager les conclusions intéressantes.

Nous avons joint à notre travail des tableaux résumant les expériences que nous avons poursuivies pendant plus de trois ans au Laboratoire de chimie biologique de la Faculté de médecine et de pharmacie de Bordeaux, sous la haute direction du Professeur H. Delaunay; ce travail, qui reprenait une partie de ses travaux, dont il tenait à confronter les résultats avec ceux donnés par des méthodes plus modernes et plus sensibles que celles qu'il avait employées. Cette thèse devait faire partie d'un vaste travail qu'il avait entrepris avec ses élèves sur l'étude complète de la cellule vivante des Invertébrés, sur la composition et le métabolisme des éléments rentrant dans cette cellule, étude dont il se réservait de donner des conclusions importantes ayant déjà en main une grande partie de l'œuvre. Sa haute culture scientifique, ses vastes connaissances en chimie biologique et en physiologie, lui permettaient d'approcher de très près la réalité du problème vital de ces animaux, données essentielles pour arriver, chez les animaux supérieurs, à une plus complète compréhension de la *vie*.

Une partie des travaux de cette thèse ont été faits à la Station biologique d'Arcachon, où M. le Professeur R. Sigalas a mis très aimablement à notre entière disposition toutes les ressources des Laboratoires marins. Qu'il veuille trouver ici l'expression de nos plus sincères remerciements.

CHAPITRE PREMIER

HISTORIQUE

Nous savons que chez les Vertébrés, l'ammoniaque se trouve dans tous les organes et le sang et qu'elle est transformée en urée ou en acide urique quand elle ne sert plus à la neutralisation des acides. C'est pourquoi chez les Vertébrés, et principalement chez l'homme, l'azote ammoniacal excrété représente seulement de 2 à 5 p. 100 de l'azote urinaire total.

Mais chez les Invertébrés, la question est toute différente puisque, comme l'a définitivement démontré notre Maître, H. Delaunay, l'excrétion ammoniacale de ces animaux varie de 4 à 80 p. 100.

En 1902, Otto von Fürth, faisant un résumé de ce qui avait paru sur la physiologie comparée des animaux inférieurs, a signalé que chez les Céphalopodes l'hypoxanthine avec l'ammoniaque et une autre substance acide indéterminée forment une notable partie de l'azote excrété. C'est que O. Cohnheim, en 1901, n'avait pas pu mettre en évidence l'ammoniaque dans les excréta des Echinodermes.

E. Weinland, en 1904, pense que l'azote ammoniacal représente un tiers de l'azote total excrété.

En 1908, J. Lesser n'en trouve que des traces chez les Vers, et Burian, en 1910, fait remarquer qu'au contraire l'ammoniaque chez les Invertébrés occupe quantitativement une place importante parmi les déchets azotés.

En 1913, H. Delaunay signale l'importance de ces déchets, et, en 1926, il montre que chez les Astéries l'azote titrable au formol représente la majeure partie de l'azote excrété, il

est formé en grande partie d'azote volatil (ammoniaque et bases volatiles).

L'excrétion azotée la mieux étudiée est celle de la Sangsue; Pütter (1908), Bialaszewicz (1919), ont constaté que l'azote ammoniacal représente 40 à 80 p. 100 de l'azote excrété.

Plus tard, Przylecki, en 1922, a montré que l'excrétion ammoniacale chez les Invertébrés est très variable et que cette ammoniaque aurait le même but de neutralisation.

H. Delaunay, en 1927, ayant étudié différents Invertébrés, arrive à cette conclusion : « un type d'excrétion très fréquent chez les Invertébrés marins est le suivant : excrétion ammoniacale forte, excrétion uréique faible. Il paraît conditionné dans une large mesure par la rapidité de l'élimination des corps ammoniacaux chez les êtres qui vivent dans l'eau.

« Le type inverse d'excrétion caractérisé par une forte excrétion uréique, associée à une faible excrétion ammoniacale, est rare chez les Invertébrés et n'a été observée que chez les Gastéropodes pulmonés (Limaces), c'est-à-dire chez des êtres adaptés à la vie aérienne, qui peuvent dans certaines circonstances manquer d'eau de circulation. »

Donc, depuis les travaux de H. Delaunay, qui ont fait autorité, de nouvelles recherches n'ont pas été entreprises sur ce sujet, mais il fallait cependant, avec des méthodes plus sensibles, et en faisant de très nombreux dosages, donner des chiffres aussi rigoureux que possible.

Mais beaucoup moins nombreux sont les auteurs qui se sont occupés de la vitesse d'élimination d'ammoniaque après l'injection de cette substance dans leur milieu intérieur et qui ont recherché les doses toxiques d'azote ammoniacal pour ces animaux.

On a souvent étudié les intoxications ammoniacales chez les Vertébrés, et les résultats qui ont été donnés ont montré que la dose de cette substance capable d'entraîner la mort était relativement faible.

Hugounencq et G. Florence ont déterminé la dose mor-

telle d'ammoniaque pour les Poissons blancs en les faisant vivre dans une solution d'urée et d'uréase.

N. Duval, en 1925, a étudié la toxicité de quelques bases chez les Poissons blancs en fonction du pH. En ce qui concerne l'ammoniaque, la durée de survie est d'autant plus faible que le pH augmente.

Enfin Morgulis, en 1923, est le seul à avoir étudié l'effet de l'injection de sels ammoniacaux chez un Crustacé : *Palinurus argus*. Il a constaté que l'ammoniaque passait très rapidement dans le sang et qu'il était très vite éliminé. L'étude de cette question méritait donc d'être reprise avec les moyens dont nous permettaient de disposer des techniques plus modernes.

Peu nombreux également sont les auteurs qui se sont occupés de *Protopterus æthiopicus*, poisson très curieux du Soudan.

Smith, en 1930, a étudié le métabolisme de ce Poisson, et il a trouvé que l'azote provenant de la dégradation des Protéines était éliminé sous forme d'urée et d'ammoniaque.

L'aperçu historique que nous venons de donner nous montre que si de nombreux auteurs se sont occupés de l'ammoniaque chez les Invertébrés, bien peu nous ont donné un travail d'ensemble sur l'excrétion ammoniacale, et les résultats qu'ils ont donnés sont difficilement comparables entre eux, car ils ont utilisé des méthodes de dosages ou différentes, ou peu sensibles, et il nous a paru utile, d'ailleurs, sur les indications de H. Delaunay, de vérifier et de reprendre tous ces différents travaux.

CHAPITRE II

Nos recherches ont porté sur les Invertébrés que l'on peut se procurer à Bordeaux, et surtout à Arcachon, où nous avons pu faire nos dosages immédiatement après la capture des animaux.

Parmi ces différents animaux, les uns sont essentiellement carnivores, l'Astérie par exemple est capable de manger des Oursins, le Poulpe se nourrit de crabes et de poissons. Les Aplysies, au contraire, n'absorbent que des algues, et il n'est pas rare d'en trouver des fragments dans leur tube digestif. Les Mollusques, eux, prennent leur nourriture dans l'eau de mer qui ne cesse de circuler entre leurs valves, ils absorbent au passage des animacules et les éléments microscopiques qui se trouvent devant leur bouche. Quant aux Vers, ils prennent dans le sable ou la terre leurs aliments.

Nous avons étudié également quelques poissons que nous avons pu nous procurer en très bon état.

Voici la liste de ces différents animaux :

Echinodermes :

Asterias Rubens;
Paracentrotus Lividus.

Vers :

Arenicola piscatorum;
Sipunculus nudus.

Crustacés :

Carcinus mœnas;
Nephrops norvegicus;
Astacus fluviatilis;
Maja squinado;
Cancer pagurus.

Mollusques :

1° Lamellibranches :
Ostrea edulis;
Mya arenaria;
Mytilus edulis.

2° Céphalopodes :
Sepia officinalis.

3° Gastéropodes :
Aplysia limacina;
Aplysia punctata;
Helix aspera;
Buccinum undatum.

Poissons :

1° Poissons osseux :
Barbus fluviatilis.

2° Poissons cartilagineux :
Cyclostomes : *Petromyzon;*
Sélaciens : *Torpedo marmorata.*

3° Poissons dipneustes :
Protopterus æthiopicus.

Récolte des matériaux d'étude.

Il est nécessaire avant d'aller plus loin de bien montrer que nos dosages furent faits sur des liquides provenant d'animaux en excellent état. C'est là un point important, car il ne fallait pas, pour donner un chiffre exact, avoir affaire

à des animaux malades. De plus, il fallait qu'ils soient placés dans leur milieu habituel, c'est pourquoi, lorsque nous nous les sommes procurés à Bordeaux, nous les avons placés dans de grands cristallisoirs avec une grande quantité d'eau de mer, ils pouvaient ainsi reprendre leur équilibre normal et éliminer tout l'ammoniaque qu'ils avaient accumulé pendant leur transport. Au bout de deux ou trois heures, nous leur changions l'eau et nous les laissions ainsi vingt-quatre heures. De cette façon, lorsque nous faisions nos prélèvements, l'animal était tel que dans sa vie normale. Mais la plupart de nos dosages furent faits à Arcachon, les animaux étaient pêchés et amenés aussitôt au laboratoire de la Station, où ils étaient conservés dans de grands bassins en attendant d'être opérés.

Le deuxième point important est le suivant : il fallait éviter la formation d'ammoniaque *post mortem* par désamination spontanée de composés ammoniogènes par hydrolyse d'azote amidé (urée, asparagine).

Prélèvement du sang ou du liquide cavitaire ou autres liquides de l'organisme.

Nos dosages ont porté surtout sur le sang, l'urine et le suc digestif, ainsi que sur le liquide cavitaire; on admet que ce dernier remplit les mêmes fonctions que le sang, c'est-à-dire qu'il contient les éléments nutritifs en même temps que les produits de déchets.

Chez les Echinodermes, la prise de l'hydrolymphe se pratique très simplement en sectionnant l'extrémité d'un bras ou de deux (pour l'Astérie) et en laissant écouler le liquide. Pour l'Oursin, il suffit de couper la membrane tout autour de la lanterne d'Aristote et de retourner l'animal sur un verre à pied, il s'écoule un liquide coloré qui est le liquide cavitaire. Le liquide cœlomique des Vers s'extrait en incisant avec les ciseaux la paroi du corps de préférence au voisinage de la tête pour ne pas léser l'intestin.

Pour avoir le sang des Crustacés (Crabe, Maja), on coupe

l'extrémité d'une des dernières pattes, et, après autotomie, on introduit une petite canule en verre dans l'orifice de l'articulation; on retourne l'animal de façon à faire écouler le liquide assez rapidement. Pour les autres Crustacés (Langoustines, Ecrevisses, Homards), on sectionne simplement la queue au niveau de la dernière articulation. On opère de même certains poissons (Barbeaux). Le sang de Torpille a été prélevé directement dans l'aorte, l'animal étant fixé sur une planche à l'aide de clous. Après dissection on introduit une canule dans l'artère mise à nue, et, par excitation, la Torpille peut donner beaucoup de sang.

Lorsque ces liquides avaient tendance à coaguler, nous les avons recueillis sur du fluorure de sodium, ou mieux sur du carbonate de lithium, comme nous l'expliquerons ultérieurement.

Chez la Maja, nous avons pu prélever de l'urine en introduisant une canule dans chaque opercule de la vessie et en laissant écouler spontanément, ou bien en aspirant à l'aide d'une seringue le liquide clair qui constitue l'urine. Pour la Seiche, nous avons prélevé directement dans les sacs urinaires.

Techniques et dosages.

Nombreuses sont les méthodes qui permettent la détermination de l'ammoniaque dans les liquides de l'organisme. Mais toutes ne sont pas rigoureusement applicables à notre étude, car nous avons eu à doser de très faibles quantités d'ammoniaque (quelques millièmes de milligramme : le γ) dans de faibles quantités de liquide. Il nous a donc fallu faire un choix judicieux et adopter une méthode offrant toutes les garanties, éviter la moindre perte ou addition d'ammoniaque.

La plupart des méthodes déplacent l'ammoniaque dans le vide par un courant d'air ou de vapeur d'eau, en milieu légèrement alcalin. L'ammoniac est recueilli en milieu acide et ensuite dosé.

Nous ne parlerons pas des méthodes qui consistent à faire entrer l'ammoniac dans une combinaison que l'on décompose secondairement (permutite, procédé de Folin et Belle), car elles nécessitent des concentrations assez élevées en ammoniaque. Il en est de même des méthodes consistant à déplacer l'ammoniaque par une base et à le capter par un acide titré (procédé Schlœsing).

Nous avons adopté la méthode d'Yovanovitch, qui se prête fort bien au microdosage de l'ammoniaque dans nos expériences.

Principe. — Cette méthode consiste à déplacer l'ammoniaque par le carbonate de lithium, à l'entraîner dans le vide par la vapeur d'eau à la température de 35 à 40° et à le retenir par une solution acide.

Nous avons ensuite adopté la méthode de Nessler, modifiée par Koch et Mc Meckin, pour doser colorimétriquement cet ammoniac.

Déplacement de l'ammoniaque.

L'appareil utilisé est celui d'Yovanovitch, qui, comme on sait, se compose d'un générateur de vapeur d'eau relié à un ballon de forme spéciale dans lequel on introduit le liquide à étudier; ce ballon est fermé à l'aide d'un bouchon en verre rodé muni d'une ampoule permettant l'accès de liquide au cours de l'opération. L'ammoniac est recueilli dans un second flacon analogue au précédent, il est lui-même relié à une trompe à eau, ou mieux à une pompe à vide électrique (vide de 10 à 20 millimètres de mercure). Le schéma de l'appareil peut se trouver dans différents manuels de biologie.

Technique. — Le bain-marie est chauffé à 40°; le liquide étudié est alors introduit dans le premier ballon avec deux gouttes de phtaléine du phénol à 2 p. 100. Dans le second ballon, nous mettons de l'acide chlorhydrique N/20. On met en marche la pompe, on ouvre légèrement le robinet de

communication afin d'avoir une seule dépression dans l'appareil. On fait alors tomber par l'ampoule qui surmonte le premier barboteur quelques gouttes de solution saturée de carbonate de lithium jusqu'à neutralisation, et, pour avoir l'alcalinité suffisante, on laisse tomber quelques gouttes supplémentaires.

Avantages de la méthode.

D'après Yovanovitch, cinq minutes de distillation suffisent pour entraîner tout l'ammoniac du liquide, et même il a constaté que, après la première minute, 80 p. 100 environ de l'ammoniaque sont déplacés. Mais nos liquides ne contenant que très peu d'ammoniaque et étant assez complexes, nous avons constaté, à la suite de très nombreux essais, que le temps de distillation était insuffisant; aussi avons-nous fait durer quinze minutes les barbotages, l'acide chlorhydrique étant changé, le barbotage continuant, nous ne retrouvions aucune trace d'ammoniac par la suite.

Comme nous voyons, cette méthode est rapide grâce au très grand pouvoir d'entraînement de la vapeur d'eau sous le vide. Les méthodes utilisant un courant d'air demandent plus de temps, il faut une heure par exemple dans la méthode de H. Delaunay, de plus on risque durant ce temps d'avoir une néoformation d'ammoniaque.

Choix de l'alcalin.

On sait que la quantité d'ammoniac libéré varie suivant l'alcali employé, car un grand nombre de composés azotés peuvent donner de l'ammoniaque par hydrolyse dans un milieu trop alcalin. Différentes solutions tampon à pH = 9,2 ont été préconisées : carbonate de sodium et oxalate de sodium, solution saturée de borate de sodium, solution saturée de carbonate de lithium. Toutes empêchent, *in vitro*, la formation d'ammoniaque dans ces liquides. Mais, avec

Leclère, nous pensons que le carbonate de lithium est celui des alcalis dont le pouvoir hydrolysant est le plus faible; aussi avons-nous employé la solution saturée à froid et filtrée.

Problème de la mousse.

Certains de nos liquides, tels que sangs, urines ou sucs digestifs sont très riches en albumine et donnent souvent une mousse abondante qui peut être entraînée et passer dans le deuxième barboteur. Les réactifs utilisés pour combattre cette mousse n'ont pas pu nous servir parce qu'ils sont eux-mêmes entraînés (alcool octylique, par exemple). Comme leur présence peut nuire au dosage de l'ammoniaque, il est nécessaire de purger le distillat par une nouvelle distillation, d'où risque de perte et par conséquent source d'erreur. Colin, en 1932, afin d'éviter ce deuxième barbotage, n'agite pas le sang violemment mais balaye simplement la surface du liquide par un courant d'air. En un mot, il empêche la formation de mousse, mais son dispositif est assez complexe.

Nous avons alors pensé, après de multiples essais, à employer l'huile d'olive pure et neutre du codex. Nous avons vérifié au préalable qu'elle ne contenait pas d'ammoniaque, puis nous avons essayé son pouvoir antimousse avec des solutions de blanc d'œuf contenant des doses variables d'ammoniaque. Nous avons toujours retrouvé la quantité d'ammoniaque mise en jeu, et, de plus, nous avons constaté que deux à trois gouttes d'huile suffisaient pour arrêter une mousse très abondante.

Dosage de l'azote ammoniacal.

Le barbotage terminé dans l'appareil d'Yovanovitch, nous nous trouvons en présence d'une solution de chlorhydrate d'ammonium. Il faut alors doser la teneur en ammoniaque de cette solution.

Avant d'adopter une technique de dosage compatible avec

les faibles doses sur lesquelles nous avions à opérer, et pouvant s'adresser à tous nos dosages, nous avons essayé comparativement les différentes méthodes utilisées actuellement pour le dosage de l'ammoniaque.

En opérant sur des solutions rigoureusement titrées de chlorhydrate d'ammonium, elles-mêmes préparées à partir de solutions plus concentrées et dosées pondéralement, nous avons essayé différentes microméthodes.

La méthode au formol-baryte de H. Delaunay nous a donné des résultats rigoureux pour des doses supérieures au centième de milligramme. Nous n'avons pas pu l'appliquer à nos travaux parce qu'il nous aurait fallu de grandes quantités de liquide; or, dans certains cas, sang de crabes, par exemple, il nous était impossible d'avoir plus de 1 à 2 cm^3 de sang.

La méthode de J. Golse (1925) traite par l'hypobromite de sodium, la solution ammoniacale; l'excès d'hypobromite libère une quantité déterminée d'iode, qui est dosée avec une solution titrée de thyosulfate de sodium. Nous n'avons pas pu l'appliquer pour les mêmes raisons que plus haut.

La méthode de Teorell (1932) peut doser de 1 à 20 γ d'azote ammoniacal. Elle est basée sur le même principe que la précédente, mais l'iode est titré au moyen d'une solution de napthylrot N/2.500 ou N/3.000. Cette méthode de grande sensibilité ne se prête pas comme les autres méthodes volumétriques à des dosages nombreux, comme nous avons eu l'occasion d'en faire au cours de nos travaux.

Nous avons alors cherché une méthode colorimétrique rapide et précise. Tout d'abord nous avons étudié la méthode de van Slyke : coloration avec les sels ammoniacaux obtenus en présence de phénol et de chlore. Mais la préparation du chlore et sa conservation était chose très délicate, et de plus nous avons constaté l'exaltation de la teinte bleue donnée par des produits autres que l'ammoniaque, notamment avec l'eau de mer sans ammoniaque, nous avions une coloration bleue très accentuée.

Méthode de Nessler.

Cette méthode, modifiée par Koch et Mc Meckin, en 1924, se prête très bien à des microdosages colorimétriques, elle donne des valeurs d'azote ammoniacal avec une précision de 0,5 γ. Il va sans dire qu'elle nécessite la plus grande asepsie chimique, mais elle se prête très bien à des dosages en série et très rapides, comme nous le verrons plus loin.

Principe. — En présence d'ammoniaque, le réactif iodomercurique donne une coloration jaune qui est proportionnelle à la quantité d'ammoniaque mise en jeu.

Réactifs :

1° Réactif de Nessler modifié :

« Dissoudre 22 g. 50 d'iode dans 20 cm³ d'eau contenant 30 grammes d'iodure de potassium. Quand la solution est complète, ajouter 30 grammes de mercure métallique pur et agiter convenablement en empêchant l'élévation de température par immersion dans l'eau froide de temps en temps. Agiter jusqu'à ce que le liquide surnageant ait perdu la coloration jaune due à la présence d'iode libre. Décanter le liquide surnageant. Quelques gouttes de ce liquide sont ajoutées à 1 cm³ d'une solution à 1 p. 100 d'amidon soluble. Si le mélange reste incolore, la solution peut encore contenir des composés mercureux. Dans ce cas, au volume de liquide décanté, on ajoute peu à peu une solution d'iode à même concentration que précédemment, jusqu'à ce qu'un léger excès d'iode libre puisse être décelé en portant quelques gouttes du mélange sur 1 cm³ de solution d'amidon soluble. Diluer alors à 200 cm³ et mélanger.

» A la solution d'iodo-mercurate de potassium ainsi préparée, ajouter 975 cm³ d'une solution d'hydroxyde de sodium pur (D = 1,33) à 10 p. 100 en volume et laisser reposer. »

Nota. — Il est préférable de conserver la solution mère d'iodomercurate de potassium et de ne préparer le réactif de Nessler que par petite quantité.

2° Eau distillée sans ammoniaque :

Pour toutes nos dilutions, nous nous sommes toujours servis d'eau distillée privée d'ammoniaque par une seconde distillation en présence d'acide sulfurique dans un appareil entièrement en verre. Nous avons conservé cette eau dans des flacons bouchés à l'émeri.

3° Solutions étalons :

Nous avons préparé une solution mère de sulfate d'ammonium à 235 mg. 8 p. 1.000 cm³.

10 cm³ de cette solution correspondent donc à 0 mg. 500 d'azote ammoniacal (N ammoniacal).

Volume de solution standard dilué à 100 cm³	N ammoniacal dans 100 cm³ de solution	N ammoniacal dans 5 cm³ exprimé en γ
—	—	—
10	0,500	25
8	0,400	20
6	0,300	15
5	0,250	10,5
3	0,150	7,5
2	0,10	5
1 ,6	0,080	4

La solution standard sous toluène est mise dans un flacon bouchant à l'émeri se conserve indéfiniment. Les solutions diluées doivent être renouvelées assez souvent, aussi est-il bon de n'en préparer que de faibles quantités à la fois.

Technique. — La liqueur chlorhydrique obtenue après barbotage est soigneusement recueillie dans un ballon jaugé de 10 ou 20 cm³. On lave plusieurs fois le tube barboteur avec de l'eau distillée sans ammoniaque. On réunit ces eaux de rinçage dans le ballon jaugé et on complète au trait de jauge avec l'eau sans ammoniaque. On agite. On prélève à l'aide d'une pipette rigoureusement propre 5 cm³ de cette solution, que l'on met dans un tube à essai, on ajoute 1 cm³ de réactif de Nessler. Au bout de trois minutes, on obtient une coloration jaune que l'on compare avec les étalons préparés en même temps.

H la hauteur de l'étalon;

H' la hauteur du liquide à doser;

X la quantité d'azote ammoniacal de l'étalon.

Nous avons :

$\frac{H}{H'} \times X$ = quantité d'azote ammoniacal de la prise d'essai.

En multipliant par les coefficients appropriés suivant la quantité de liquide mise en jeu et le volume de la prise d'essai, nous aurons la quantité de N ammoniacal pour 100 cm³ de liquide étudié.

Nota. — Tout notre matériel en verre, pipettes, tubes à essai, appareil d'Yovanovitch, doit être lavé avec le plus grand soin pour ne pas avoir la moindre trace d'ammoniaque. Nous nous sommes servis pour cela du mélange sulfochromique.

*
* *

Dans certains cas, il nous a paru intéressant de connaître, en même temps que la teneur en azote ammoniacal du liquide étudié, la teneur en azote hypobromite et la teneur en azote total.

Les techniques que nous avons utilisées pour ces deux déterminations sont les suivantes :

Azote hypobromite. — Nous avons adopté l'appareil de Mestrezat, ou uréomètre à mercure, pour la détermination par gazométrie de l'azote dit hypobromite (azote urée + azote ammoniacal).

Les liquides que nous avons eu à étudier ont été concentrés au bain-marie à 60° C. en milieu neutre, jusqu'à très petit volume (1 à 2 cm³ p. 100 ou 60 cm³ de liquide).

L'hypobromite employé a été préparé suivant la formule de Fleury, solution A contenant le brome, solution B contenant l'hydroxyde de sodium. Pour avoir des résultats comparables entre eux, nous avons tenu compte pour chaque cas de la température et de la pression barométrique.

Azote total. — Ce dosage comprend deux temps :

1° la transformation de l'azote des divers corps azotés en ammoniaque par la méthode de Kjeldahl;

2° le titrage au Nessler de l'ammoniaque, après distillation dans l'appareil d'Yovanovitch.

1° *Minéralisation.* — Dans un ballon Kjeldahl, on introduit un volume de liquide à étudier variable suivant sa richesse présumée en azote (10 à 25 cm^3 pour les eaux dans lesquelles ont vécu les animaux). On ajoute 1 cm^3 d'acide sulfurique pur (au soufre) et VI gouttes de la solution d'oxalate de potassium à 30 p. 100. On chauffe jusqu'à décoloration en prenant les précautions d'usage.

2° *Distillation de l'ammoniaque.* — Pour être bien sûr que tous nos résultats soient comparables entre eux, c'est-à-dire que le dosage final soit toujours fait dans les mêmes conditions, nous avons pensé à utiliser pour la distillation de l'ammoniaque de nos Kjeldahl l'appareil d'Yovanovitch. La solution acide résiduelle est alors étendue d'eau distillée sans ammoniaque et versée dans le premier ballon de l'appareil d'Yovanovitch; on rince à plusieurs reprises le ballon Kjeldahl et les eaux de rinçages sont jointes au liquide précédent.

3° *Nesslérisation.* — On opérera comme nous l'avons indiqué pour les dosages de l'ammoniaque dans la technique générale.

CHAPITRE III

ETUDE ANALYTIQUE

ECHINODERMES

Depuis longtemps déjà, on s'est occupé d'étudier l'excrétion azotée des Echinodermes. Conhein en 1901, affirme que les Holothuries, les Astéries et les Ophiures n'excrètent pas d'ammoniaque, leurs liquides cavitaires, comme celui des Oursins, étant de l'eau de mer pure, mais donnant cependant une coloration plus forte au réactif de Nessler que l'eau de mer.

En 1912, H. Delaunay, en étudiant la répartition de l'azote pour 100 cm^3 de liquide centrifugé, a signalé la présence en petite quantité des corps azotés parmi lesquels il trouve de l'ammoniaque (0 mg. 2 à 0 mg. 6 p. 100 pour l'Astérie).

Myers en 1920, a trouvé lui aussi de l'ammoniaque dans ce liquide, et notamment pour *Strongylocentrotus francescamus*, il trouve 0 mg. 08. Mais, d'après Van Der Heyde, le liquide cavitaire d'*Asterias forbesi* ne contient pas d'ammoniaque, de même que dans le liquide cœlomique des oursins, le seul corps azoté que l'on puisse trouver est de l'acide urique.

En 1927, H. Delaunay, dans ses recherches biochimiques sur l'excrétion azotée des Invertébrés, donne les derniers résultats qu'il a obtenus. Il trouve en effet pour les Astéries (*Asterias rubens*) 0 mg. 30 à 0 mg. 45 d'azote ammoniacal p. 100, et, pour les Oursins (*Paracentrotus lividus*), 0 mg. 24 p. 100 de liquide cavitaire centrifugé. Et H. Delaunay,

réfutant définitivement l'hypothèse de Van Der. Heyde, montre que ces liquides cavitaires contiennent, comme le sang des Vertébrés, les mêmes déchets azotés, l'azote ammoniacal représentant environ 10 à 20 p. 100 de l'azote total non protéique.

Nous avons repris, avec notre méthode, la recherche de l'azote ammoniacal chez *Asterias rubens* et *Paracentrotus lividus*, principaux Echinodermes que l'on trouve en abondance dans le Bassin d'Arcachon. Nous avons prélevé le liquide cavitaire d'un certain nombre d'animaux afin d'obtenir suffisamment de liquide pour faire nos dosages après extraction de l'ammoniaque par l'appareil d'Yovanovitch. Plusieurs fois, dans le courant du mois de septembre 1934, nous avons eu à notre disposition des Astéries et des Oursins, et voici les différents chiffres obtenus exprimés en γ d'azote ammoniacal pour 100 cm^3 de liquide cavitaire :

Animaux	—	Chiffres trouvés								Chiffres limites	
Astéries.....	104	240	356	300	214	167	160	216	250	104	356
Oursins.....	216	144	109	133	100	96	106	—	—	96	216

Moyenne :

Astérie, 228 p. 100 cm^3;
Oursins, 129 p. 100 cm^3.

Le liquide cavitaire d'Oursin semble un peu moins riche en ammoniaque que celui d'Astérie. Nos chiffres sont légèrement inférieurs à ceux trouvés par H. Delaunay, mais, si nous ne considérons que l'ordre de grandeur, nous voyons qu'il est le même. La teneur en ammoniaque de ces liquides est assez faible, mais reste supérieure cependant à celle du sang des vertébrés.

VERS

L'excrétion des Vers a été étudiée pour la première fois par E. Weinland en 1920. Plus tard, Flury a repris les

mêmes travaux sur l'Ascaris, et lui aussi a trouvé que l'ammoniaque existait en quantité assez abondante dans les excreta de ces vers. Mais l'excrétion azotée la mieux connue est celle de la Sangsue (A. Pütter, Bialaszewiez, St. J. Pzylecki, H. Delaunay, Mme Braconnier).

H. Delaunay a également étudié l'excrétion de *Lumbricus agricola*, *Aphrodite aculeata* et *Sipunculus nudus*. Et il conclut que cette excrétion est semblable à celle des Echinodermes, c'est-à-dire présence d'azote ammoniacal en quantité importante par rapport à l'azote total non protéique.

Le liquide cavitaire étant leur milieu d'échange, nous avons fait quelques dosages afin de déterminer la teneur moyenne de ce milieu en azote ammoniacal. Voici les chiffres publiés par H. Delaunay :

pour *Aphrodite aculeata* : 0 mg. 70 et 0 mg. 60 p. 100;
pour *Sipunculus nudus* :

0 mg. 80 p. 100 de sang total;
0 mg. 30 p. 100 de plasma.

Arenicola piscatorum.

Nous avons pu avoir un lot de ces vers vivant dans un milieu marin. Ils possèdent deux vaisseaux sanguins, l'un dorsal, l'autre ventral. Nous n'avons pu recueillir que le liquide cavitaire, le sang étant en trop faible quantité pour pouvoir faire un dosage.

Pour obtenir le liquide cavitaire, nous avons fait une incision un peu au-dessous de la tête, sur la face ventrale, et nous avons laissé écouler le liquide.

Nous avons obtenu comme teneur en azote ammoniacal, pour 100 cm^3 de liquide cavitaire, 396 γ.

Sipunculus nudus.

Le Siponcle est un des vers marins les plus faciles à se procurer. H. Delaunay avait déjà déterminé la teneur en

azote ammoniacal du sang de Siponcle. Il trouve une quantité variant entre 0 mg. 8 et 1 mg. 7 pour 100 cm^3.

Nous avons repris ces dosages sur plusieurs lots de Siponcles que nous avons reçus d'Arcachon à différentes époques de l'année. On sait que le liquide cavitaire de ces animaux est blanc rosé et qu'il se colore en rouge violacé par suite de l'oxydation de l'Hémérythrine, pigment ferrugineux.

La centrifugation de ce sang donne, d'une part, un liquide incolore : le plasma, et d'autre part, des éléments figurés comprenant : les hématies colorées et occupant le fond du tube et des éléments blancs.

Nous avons déterminé la teneur en azote ammoniacal du sang total et celle du plasma. Nous avons essayé d'avoir la teneur en azote ammoniacal des éléments figurés, nous n'avons jamais pu obtenir directement un chiffre exact, car ces éléments sont organisés, ils peuvent donc donner de l'ammoniaque aussitôt détruits. C'est ce qui explique pourquoi nous avons toujours trouvé, lorsque nous avons essayé, un chiffre d'azote ammoniacal supérieur à celui trouvé dans le sang total. Aussi, pour connaître la richesse en ammoniaque de ces éléments, nous avons employé la méthode indirecte, qui consiste à doser l'azote ammoniacal dans 10 cm^3 de sang total et dans le plasma de 10 cm^3 de sang total prélevé en même temps et centrifugé; par différence entre les deux résultats, nous avons eu la teneur en azote ammoniacal des éléments figurés.

En effet, après avoir saigné plusieurs Siponcles pour obtenir une quantité de sang de 25 cm^3 au moins, et après avoir parfaitement homogénéisé, nous avons prélevé à la pipette 10 cm^3 que nous avons mis immédiatement dans l'appareil d'Yovanovitch et 10 cm^3 que nous avons centrifugé dans des tubes gradués de façon à avoir les volumes relatifs des éléments figurés et du plasma. Sur ce plasma, nous avons fait les mêmes déterminations que sur le sang total.

Premier cas.

10 cm³ de sang total contiennent 37 γ de N ammoniacal;
7 cm³ de plasma correspondant à 10 cm³ de sang total ont donné 35 γ de N ammoniacal,

ce qui nous donne une concentration de :

45 γ 5 de N ammoniacal pour 10 cm³ de plasma;
9 γ 5 de N ammoniacal pour 10 cm³ d'éléments figurés.

Deuxième cas.

10 cm³ de sang total contiennent 40 γ de N ammoniacal;
7,3 cm³ de plasma correspondant à 10 cm³ de sang total ont donné 34 γ de N ammoniacal,

ce qui nous donne une concentration de :

46 γ 5 de N ammoniacal pour 10 cm³ de plasma;
22 γ 2 de N ammoniacal pour 10 cm³ d'éléments figurés.

Troisième cas.

10 cm³ de sang total contiennent 50 γ de N ammoniacal;
5 cm³ de plasma correspondant à 10 cm³ de sang total ont donné 33,3 γ de N ammoniacal,

ce qui nous donne une concentration de :

66 γ 6 de N ammoniacal pour 10 cm³ de plasma;
33 γ 3 de N ammoniacal pour 10 cm³ d'éléments figurés.

Donc, la plus grosse quantité contenue dans le sang est éliminée par le plasma, bien que les hématies en transportent également une quantité notable; en effet, le rapport de l'azote ammoniacal des éléments figurés à l'azote ammoniacal du plasma est compris pour nos expériences entre 0,20 et 0,50, mais les hématies feraient surtout la synthèse de l'urée, car ce corps y a été trouvé en grande quantité. Ce serait là une confirmation de l'hypothèse émise par H. Delaunay dans

son rapport sur le métabolisme de l'ammoniaque, à savoir que les hématies seraient douées d'un pouvoir uréopoiétique qui aurait pour effet d'éviter l'accumulation des sels ammoniacaux dans le liquide cavitaire.

Hirudo officinalis.

C'est en 1901 que A. Putter a étudié la répartition de l'azote dans l'eau où ont vécu les Sangsues. Il a signalé la présence d'une grande quantité d'ammoniaque qui peut atteindre 40 à 60 p. 100 et même 75 p. 100 de l'excrétion azotée totale.

En 1926, St-J. Przylecki a trouvé que l'ammoniaque excrété servait à neutraliser les acides non comburés. Il a étudié les variations de l'excrétion ammoniacale en plaçant les sangsues dans des solutions acides ou alcalines; l'ammoniaque diminue quand les animaux sont placés dans une solution alcaline (CO^3Na^2 à 0 g. 10 et 0 g. 20 p. 100). Il en a conclu que « le mécanisme régulateur de l'excrétion ammoniacale s'effectue sur les mêmes principes chez les différents types d'animaux (Vertébrés, Vers, Mollusques), et que, chez un grand nombre d'Invertébrés, il existe un mécanisme réglant l'équilibre acide base du milieu interne de l'animal ».

En 1926, H. Delaunay a donné une autre explication, la Sangsue se comporterait comme tous les Invertébrés aquatiques, c'est-à-dire qu'elle n'a pas besoin, elle non plus, de transformer en urée et acide urique, corps moins toxiques que l'ammoniaque, les bases azotées volatiles libérées au cours des échanges : « tout se passe comme si les êtres aquatiques dont l'épuration est constante et facile excrétaient les bases azotées volatiles plus facilement que les animaux qui peuvent manquer d'eau de circulation dans diverses circonstances ».

Nous n'avons pas repris l'étude de l'excrétion ammoniacale de la Sangsue, car récemment Mme Braconnier a donné des chiffres en tout point comparables à ceux de H. Delaunay.

Nous avons simplement repris les expériences de Przylecki au sujet de la variation de l'ammoniaque excrété à pH différents. Nous nous sommes placés à des pH de 5, 7 et 8 obtenus avec des solutions tampons permettant cependant l'existence des animaux.

Nous avons mélangé à cet effet une solution M/15 de phosphate diacide de sodium et une solution M/15 de phosphate acide de sodium. Nous avons employé du phosphate diacide de sodium plutôt que du phosphate diacide de potassium, car nous savons que les sels de potassium sont en général plus toxiques que les sels de sodium.

Le mélange de ces deux solutions était dilué au demi et nous a permis ainsi d'avoir des solutions dans lesquelles les Sangsues vivaient très normalement, sans aucune manifestation de gêne, et pendant très longtemps, et d'autre part d'avoir un pH constant pendant toute la durée de nos expériences.

Des sangsues étant placées dans ces milieux, nous avons étudié comparativement les variations de l'azote ammoniacal et de l'azote total, et nous avons déterminé le rapport pour 100. Voici dans le tableau ci-dessous résumé les résultats de nos expériences :

Durée en heures	Volume d'eau en cm³	Poids en gr.	pH	Par 100 grammes et par 24 heures		
				N (NH^4) en mg.	N. total en mg.	Rapport %
70	92.3	9.23	5.5	5.136	8.640	59,4
70	154.3	15.43	7.0	4.900	6.504	73.8
48	151.0	15.10	8.0	6.648	7.992	83.1
22	158.6	21.155	CO^3Na^2 0.15	1.963	3,052	64.3

Pour un pH de 7, le rapport est de 73,8, les Sangues excrètent donc beaucoup d'ammoniaque, et ceci est conforme aux données déjà acquises de Pütter et Bialaszewicz. Przylecki, lui aussi, trouve qu'à 22° les animaux excrètent pendant vingt-quatre heures et 100 grammes de poids 75 p. 100 d'azote sous forme d'ammoniaque. Mais nous trouvons que,

lorsque le pH est légèrement acide (pH = 5,5), le rapport diminue alors qu'il augmente légèrement en milieu alcalin.

Mais il nous a été difficile de refaire les expériences de Przylecki, car, dans un milieu contenant 0 g. 15 de carbonate de sodium, comme l'indique l'auteur, les Sangsues ne résistaient pas plus de vingt-deux heures; à ce moment-là, elles étaient en très mauvais état et nous avons été obligés de désalbuminer l'eau dans laquelle elles avaient vécu par l'acide trichloracétique et de filtrer. Dans ce cas, nous avons trouvé que le rapport s'abaissait à 64 p. 100.

CRUSTACES DECAPODES

De nombreux auteurs ont essayé de caractériser les déchets azotés dans le sang des Crustacés, car c'est là qu'on doit trouver les principaux corps formés au cours des échanges et destinés à l'excrétion. Chez les grands Crustacés décapodes, nous avons pu recueillir en même temps que le sang un liquide qui est fourni par les glandes antennaires. Ce liquide peut être considéré comme de l'urine, c'est en tout cas un liquide d'excrétion. Il peut être retiré directement comme l'ont indiqué Marchal et H. Delaunay. Ces deux auteurs ont trouvé qu'elle contenait de l'ammoniaque. Marchal a, en effet, signalé dans son étude du liquide cavitaire qu'il trouvait des traces d'ammoniaque dans l'urine. Il avait obtenu une légère coloration avec le réactif de Nessler. H. Delaunay a donné des chiffres plus élevés; voici les doses qu'il trouve, rapportées à 100 cm^3 d'urine, exprimés en milligrammes d'azote ammoniacal : 0 mg. 22, 0 mg. 93, 0 mg. 940, 0 mg. 900, ce qui donne comme chiffre moyen, 0 mg. 51 pour la *Maja*.

Pour le sang, les recherches sont plus nombreuses et plus importantes. Myers a trouvé pour *Cancer productus* 1 mg. 05 d'azote ammoniacal p. 100, et H. Delaunay donne pour *Maja squinado*, 2 mg. 1, 2 mg. 4, 2 mg. 7. Il donne comme chiffres

limites pour *Cancer pagurus*, 0 mg. 80; pour *Palinurus vulgaris*, 2 mg. 50, enfin 2 mg. 2 pour *Astacus fluviatilis*. Et il conclut qu'il se forme très certainement au cours des échanges de l'ammoniaque et que les bases azotées volatiles jouent un rôle important dans l'excrétion des Crustacés puisqu'on les trouve dans le sang et les organes.

Nous avons pu reprendre l'étude de cette question chez quelques Crustacés très faciles à se procurer tant à Bordeaux qu'à Arcachon.

Maja squinado.

Les *Maja* que nous avons étudiées proviennent du Bassin d'Arcachon. La plupart sont restées dans les bassins de la Station plusieurs jours, elles étaient donc à jeun. Nous les avons saignées suivant la technique habituelle, section d'une patte, et, après autotomie, introduction d'une canule en verre à travers le sphincter de l'articulation. D'autre part, l'urine a été recueillie dans la vessie à l'aide d'une canule. Nous avons fait plusieurs séries de dosages : les uns en juin-juillet 1934, d'autres en septembre 1934 et en septembre 1935.

Dans le tableau suivant, nous donnons nos résultats en azote ammoniacal pour 100 cm^3 :

Liquides	Chiffres trouvés							Chiffres moyens
Sang.....	950	1.210	336	917	266	635	534	692
Urine	—	—	—	100	217	500	—	272

H. Delaunay, qui a étudié aussi *Maja squinado*, donne comme chiffres limites du taux de l'azote ammoniacal dans le sang chez cet animal de 450 γ à 2.400 γ, le taux dans l'urine variant entre 220 γ et 930 γ. Dans les cas normaux, nous n'avons jamais obtenu des doses si fortes; mais nous avons trouvé une accumulation d'ammoniaque dans l'organisme lorsque les échanges avec le milieu extérieur ne se

font plus ou se font mal, nous verrons ceci dans le chapitre des intoxications.

Cancer pagurus.

Nous avons pu nous procurer facilement dans le commerce de gros crabes, ou Crabes tourteaux (*Cancer pagurus*). Aussitôt arrivés au laboratoire, ils ont été mis dans de grands cristallisoirs avec une quantité d'eau de mer suffisante pour que les Crabes puissent s'épurer convenablement. Au bout de deux heures, nous avons changé l'eau qui était souillée par des débris de paille et autres impuretés. Mis de nouveau dans de l'eau de mer propre, nous les y avons laissés vingt-quatre heures, de sorte qu'au moment de la saignée l'animal se trouvait dans des conditions de vie normale.

H. Delaunay a étudié le sang de Crabes sortant des bassins de la Station d'Arcachon et étant à jeun depuis plusieurs jours; il a trouvé dans le sang de ces Crabes 0 mg. 800 d'azote ammoniacal pour 100 cm³.

Myers a dosé l'azote ammoniacal de *Cancer productus*, il a trouvé 1 mg. 05 pour 100 cm³ de sang.

Nous avons eu deux Crabes : le premier pesait 765 grammes, après avoir séjourné deux heures dans l'eau de mer nous avons fait une première prise de sang. Nous avons trouvé alors 2 mg. 272 d'azote ammoniacal pour 100 cm³ de sang. Tandis que, vingt-quatre heures après, l'animal s'étant complètement épuré ne donnait plus comme taux d'ammoniaque que 0 mg. 450.

Le second Crabe pesait 900 grammes, nous ne l'avons sacrifié qu'après épuration totale. Nous avons obtenu les résultats suivants :

Sang, 0 mg. 682 azote ammoniacal p. 100;
Urine, 0 mg. 800 azote ammoniacal p. 100.

Nous voyons donc que l'ammoniaque est capable de s'accumuler en grande quantité dans le sang lorsque l'animal vit dans l'air et qu'aussitôt dans l'eau de mer il l'élimine

très rapidement. Du reste, nous étudierons plus particulièrement dans le chapitre suivant cette accumulation d'ammoniaque dans l'organisme et son élimination.

Néanmoins nous trouvons peu de différence dans le taux d'ammoniaque chez *Cancer pagurus* et chez *Maja squinado*. Ces deux Crustacés étant en effet très voisins l'un de l'autre.

Carcinus mœnas.

Carcinus mœnas, ou petit Crabe, est très commun dans nos régions. Il nous a été très facile d'avoir à différentes époques de l'année plusieurs échantillons. Nous avons pu faire de nombreux dosages par suite de la grande résistance de ces animaux; il nous a été facile de les garder très longtemps au laboratoire en renouvelant assez souvent l'eau de mer dans laquelle ils vivaient.

H. Delaunay a signalé que l'ammoniaque du sang était de 2 mg. 10 d'azote ammoniacal pour 100 cm³.

Nous avons fait deux séries de dosages :

Les premières recherches furent faites sur des Crabes qui avaient vécu dans l'eau de mer;

Les secondes chez des Crabes étant restés quelque temps dans l'air.

1° *Dans l'eau de mer :*

Juin 1934..	0 mg. 800	0 mg. 900	1 mg. 230	1 mg. 000
Janvier 1935	0 mg. 800	0 mg. 700	1 mg. 250	—
Juin 1935..	0 mg. 666	1 mg. 100	1 mg. 195	—

Chiffre moyen : 0 mg. 943 d'azote ammoniacal pour 100 cm³ de sang.

2° *Dans l'air :*

Crabes restés :

10 heures dans l'air	1 mg. 070
24 heures dans l'air	1 mg. 212
30 heures dans l'air	2 mg. 000
	1 mg. 507
40 heures dans l'air	2 mg. 152

Chiffre moyen : 1 mg. 588 d'azote ammoniacal pour 100 cm³ de sang.

Le taux d'ammoniaque dans le sang semble être un peu plus élevé que chez les gros crustacés. Et dans l'air ce taux s'élève progressivement.

Nous avons en outre essayé d'étudier l'excrétion ammoniacale par les branchies. Dans le même but, Smith avait déjà constaté que la Carpe et le Cyprin doré éliminent plus d'azote ammoniacal par les branchies que par les reins, la teneur en ammoniaque de l'eau environnant les branchies étant plus forte que dans le sang. Plus récemment, en janvier 1937, Von Altfried Mollitor constate que l'excrétion de l'ammoniaque chez *Eriochier* se fait surtout par les branchies.

Dans une expérience, les Crabes étant préalablement pesés, sont mis dans une cloche à deux tubulures permettant une aération continue. L'une de ces tubulures communique avec l'air extérieur par l'intermédiaire de deux flacons laveurs à acide sulfurique. L'autre est en relation avec une trompe à eau faisant office d'aspirateur, sur le trajet de laquelle sont placés deux flacons laveurs contenant chacun moins de 5 cm³ d'une solution N/20 d'acide chlorhydrique. Ces derniers flacons sont destinés à recueillir l'ammoniaque excrétée par les Crabes.

La trompe à eau étant mise en marche à allure très réduite, trois heures après nous recueillons l'acide chlorhydrique des flacons laveurs et nous le remplaçons par une nouvelle charge d'acide, et ainsi de suite toutes les trois heures.

La nuit, les Crabes étaient laissés à une plus faible aération.

En juin :

Lot A : poids, 120 grammes; température, 23°.
Lot B : poids, 125 grammes; température, 20°.

En janvier :

Lot C : poids, 240 grammes; température, 12°.

En mars :

Lot D poids, 270 grammes; température, 10°.

Temps	3 heures		3 heures		3 heures		3 heures		3 heures	
	Total	%	Total	%	Total	%	Total	%	Total	%
Lot A 120 g...	23,8	19,8	40,0	33,3	35,0	29,1	20,0	16,6	24,0	20,0
Lot B 125 g...	18,0	14,4	10,0	8,0	»	»	»	»	»	»
Lot C 240 g...	9,5	4,0	6,0	2,5	13,0	5,4	27,0	11,2	24,0	10,0

Temps	7 heures		17 heures		5 heures		3 heures	16 heures	
Lot D 270 g...	15,0	4,4	22,7	8,4	10,7	4,0	traces	20,0	7,4

Nos résultats sont exprimés en γ d'azote ammoniacal, d'une part pour la totalité des Crabes en expérience (colonnes total), d'autre part pour 100 grammes de Crabe (colonne %).

Interprétation des résultats. — Nous pouvons dire que les doses d'azote ammoniacal que nous avons trouvées sont assez faibles, mais elles ne sont pas nulles et permettent un dosage précis. Or, il apparaît que la question température joue un certain rôle puisqu'en juin les échanges sont plus actifs (élimination plus forte d'ammoniaque) qu'en janvier et en mars. Il semble donc que cette ammoniaque proviendrait d'une substance ammoniogène transformée en ammoniaque au niveau des branchies.

Astacus fluviatilis.

En mars et en mai 1935, nous avons eu des Ecrevisses bien vivantes. A ces deux époques, nous les avons laissées dans l'eau douce vingt-quatre heures, puis nous les avons saignées en coupant l'extrémité de la queue. Dans leur sang, nous avons trouvé des doses d'azote ammoniacal allant de 650 γ à 800 γ pour 100 cm³, teneurs semblables à celles des Crustacés précédents.

Nephrops norvegicus.

Nous avons traité de la même façon que les Ecrevisses les Langoustines que nous avons pu nous procurer à Bordeaux. Les différents dosages que nous avons faits nous ont donné des chiffres très voisins les uns des autres, et le chiffre moyen de 923 γ d'azote ammoniacal pour 100 cm^3 de sang peut être considéré comme la teneur normale pour ces animaux.

Homarus vulgaris.

A deux reprises différentes, en février et en mars, nous avons pu doser l'ammoniaque dans le sang d'animaux en très bon état. L'animal est saigné par la queue, et le sang est recueilli directement dans la solution de carbonate de lithium utilisée pour le passage à l'appareil d'Yovanovitch. Les deux chiffres que nous avons obtenus sont très voisins l'un de l'autre : 1.136 γ d'azote ammoniacal p. 100 dans le premier cas et 1.171 γ p. 100 dans le second cas.

*
* *

De ces recherches nous pouvons conclure que le taux d'azote ammoniacal dans le sang des Crustacés est important mais variable et qu'il dépend surtout du genre de vie et d'alimentation de ces animaux. Quoi qu'il en soit, ces variations ne sont pas d'une excessive importance, car, dans tous les cas, elles restent très largement supérieures à celles des Vertébrés.

MOLLUSQUES

I. — Lamellibranches.

L'excrétion d'ammoniaque par les Lamellibranches n'a été étudiée principalement que par Przylecki et H. Delaunay. Przylecki a dosé l'ammoniaque de l'eau où avaient séjourné

des Anodontes à une température de 16 à 18° C. Il a trouvé 6,3 d'azote sous forme d'ammoniaque; ce rapport s'élevant lorsque ces animaux étaient placés dans de l'eau acidulée par de l'acide sulfurique N/10. H. Delaunay a étudié la Mye et l'Huître, il indique que ces animaux excrètent de l'ammoniaque en quantité notable tout comme les autres Invertébrés. Dans l'eau de mer où ont séjourné les Myes, il trouve 0 mg. 43 p. 100 cm³ et 0 mg. 48 p. 100 dans le liquide interne, dans l'eau des Huîtres, 0 mg. 45 p. 100.

Mya arenaria.

Les Myes que nous avons étudiées provenaient d'Arcachon. Nous avons étudié le liquide intervalvaire ainsi que le sang de ces animaux.

Le liquide intervalvaire est recueilli d'abord. On maintient les deux valves de la Mye entrouvertes à l'aide de petits morceaux de liège; l'animal est égoutté sur un verre à pied. Nous sectionnons le pied de la Mye, qui est laissée au repos. Le sang s'écoule alors et nous le recueillons dans un verre différent de celui du liquide intervalvaire. Ce sang présente une légère opacité et contient un peu d'albumine, ce qui le distingue nettement de l'eau intervalvaire.

Voici résumés les différents dosages que nous avons faits :

	Sang	Eau intervalvaire
	333	—
	—	222
	—	147
	264	183
	100	190
	—	235
Moyennes.....	232	195

Ces chiffres représentent des γ d'azote ammoniacal pour 100 cm³ des liquides étudiés.

Ces résultats se rapprocheraient de ceux trouvés pour les Echinodermes.

Gryphea angulata. — Cardium edule. — Mytilus edulis.

H. Delaunay avait déjà étudié l'Huître et la Moule, il n'avait cherché l'ammoniaque que dans l'eau intervalvulaire des Huîtres et avait trouvé 0 mg. 450.

Nous avons refait quelques dosages : sur de grosses Huîtres portugaises du Bassin d'Arcachon, et nos chiffres ont toujours oscillé entre 250 γ et 325 γ, chiffres inférieurs à ceux trouvés par H. Delaunay; mais nous n'avons jamais obtenu de résultats plus faibles, ce qui prouverait bien que ces animaux excrètent de l'ammoniaque.

Les Coques (*Cardium edule*) furent achetées à Bordeaux et mises pendant quelques minutes dans de l'eau de mer. L'eau intervalvaire contenait 1.200 γ d'azote ammoniacal, et l'eau de mer dans laquelle elles étaient restées contenait 333 γ d'azote ammoniacal p. 100; ces chiffres élevés correspondraient à une accumulation d'ammoniaque pendant le transport, fait analogue à celui que nous avons vu pour le Crabe.

Enfin, pour la Moule (*Mytilus edulis*), nous avons étudié séparément le sang et le liquide intervalvaire. Mais les Moules comme les Coques avaient été achetées au marché et avaient accumulé beaucoup d'ammoniaque dans leur sang. On en trouve en effet 928 γ d'azote ammoniacal p. 100 et dans le liquide intervalvaire 362 γ p. 100.

Les Lamellibranches excrètent donc de l'ammoniaque comme les autres Invertébrés déjà étudiés.

II. — Céphalopodes.

Les Céphalopodes sont parmi les Invertébrés les animaux les plus différenciés au point de vue physiologique. Aussi est-il intéressant de les étudier.

Lindemann, en 1900, avait étudié l'urine de l'Eledone et avait décelé de l'ammoniaque.

Fürth, un peu plus tard, étudia l'urine de Poulpe. Et nombreux sont les travaux de H. Delaunay portant surtout sur la Seiche et le Poulpe.

Voici les différents chiffres obtenus par lui pour le sang et l'urine de ces animaux :

Seiche :

Sang ...	3 mg. 8	2 mg. 4	2 mg. 8	4 mg. 8
Urine ...	92 mg.	87 mg.		

Poulpe :

Sang ...	33 mg. 8	1 mg. 6
Urine ...	40 mg.	

Ces résultats sont exprimés en milligrammes d'azote ammoniacal pour 100 cm^3.

H. Delaunay a également déterminé au cours de son important travail sur l'excrétion azotée des Invertébrés la teneur en azote ammoniacal du liquide gastrique. Il trouve 9 mg. 6 et 16 mg. 8 p. 100. Et il arrive à cette conclusion que l'excrétion ammoniacale chez ces animaux est très importante, surtout par les corps fungiformes, qui fonctionnent comme les reins des Vertébrés, montrant une sélection élective pour l'ammoniaque.

Nous avons repris ces travaux et cherché d'une façon précise le taux d'azote ammoniacal contenu dans le sang, l'urine, le liquide digestif et quelquefois dans le noir de la Seiche. Ces animaux étant en assez grande abondance au printemps dans le Bassin d'Arcachon, nous avons pu en saigner un certain nombre, de façon à pouvoir donner un chiffre moyen exact.

Nous avons recueilli le sang de la Seiche d'une façon un peu différente de celle indiquée par H. Delaunay dans sa thèse de doctorat ès sciences. Il fallait introduire une fine canule dans l'aorte de la Seiche, l'opération était très délicate, et comme nous opérions dès la capture de ces animaux, c'est-à-dire sur le bateau même, nous avons préféré l'autre technique préconisée par H. Delaunay lui-même.

La Seiche est posée sur un liège un peu incliné et elle est maintenue par la tête. A l'aide d'une pince hémostatique, on

oblitère la poche du noir, puis on sectionne longitudinalement la face ventrale et on récline de chaque côté les bords du manteau, les branchies restent accolées à la paroi palléale; on fait alors une ligature du conduit de la poche du noir, et, à l'aide de coton, on tamponne aussi délicatement que possible l'intérieur de la Seiche ainsi que les parois de façon à enlever toute trace d'eau de mer. On fait avec le muscle de la paroi et à la base de la branchie droite ou gauche une espèce de petit godet destiné à recevoir le sang. Ce dernier est obtenu après section de l'artère branchiale. Avec une pipette on recueille ce sang, qui devient rapidement bleu au contact de l'air. L'urine a été prélevée directement dans le sac rénal. Le liquide gastrique est obtenu par incision directe de l'estomac. Le noir est recueilli de la même façon.

Nos dosages ont été faits sur des Seiches capturées à Arcachon au mois d'avril et mai 1935. A titre d'indication, nous avons mis à côté de nos chiffres le sexe de chaque animal étudié.

Le tableau suivant donne les résultats que nous avons obtenus, exprimés en milligrammes d'azote ammoniacal pour 100 cm³ de liquide :

Date	Sexe	Numéros des animaux	Sang	Urine	Liquide gastrique	Noir
Avril...	♂	3	3,846	82,300	—	—
— ...	♀	4	0,937	93,899	10,256	—
— ...	♂	5	2,083	121,950	—	—
— ...	♀	6	—	64,510	—	—
— ...		7	1,860	—	—	—
Mai.....	♂	1	0,430	130,187	—	—
—	♂	2	1,136	138,875	—	—
—	♀	3	—	88,125	13,875	44,718
—	♂	4	0,833	89,375	8,625	—
—	♂	5	1,312	—	—	—
—	♂	6	1,175	133,432	—	29,412
—	♀	7	1,280	—	—	—
—	♂	8	1,190	—	8,925	—
—	♂	9	0,650	—	—	—
—	♀	10	1,250	—	—	—
—	♂	12	1,875	—	—	—
	♂	14	—	96,150	—	—

De ce tableau, il ressort que le sang de Seiche est riche en ammoniaque; en effet, dans sa traversée du foie, organe très riche en cette substance (H. Delaunay), sa concentration augmenterait dans de grandes proportions. L'urine en contient aussi beaucoup, environ cent fois plus que le sang. Les corps fungiformes font le même travail que les reins chez les Vertébrés, ils laissent passer les déchets contenus dans le sang, ils ont donc un rôle d'excrétion; de plus, ils ne sont pas de simples dialyseurs comme les glandes antennaires des Crustacés, puisqu'ils sont capables d'opérer un changement de concentration, celle-ci passe en effet de 1 à 100.

Le liquide gastrique et le noir ne semblent pas être des voies d'élimination, les quantités d'ammoniaque trouvées n'étant pas très élevées. Seul les corps fungiformes ont une fonction excrétrice importante chez l'animal normal.

*
* *

Nous avons pu nous procurer également des œufs de Seiche, qui se présentent sous forme de grappes, fortement colorées en noir. Nous avons dosé l'azote ammoniacal du liquide embryonnaire qu'ils contiennent. Après désalbumination, nous avons obtenu le chiffre de 16 milligrammes d'azote ammoniacal pour 100 cm^3 de liquide pour un premier lot et 15 mg. 5 pour un deuxième lot. Ces faits semblent indiquer que l'embryon se décharge dans ce liquide des déchets provenant de sa segmentation et de son accroissement cellulaire.

III. — Gastéropodes.

L'étude biochimique de l'excrétion azotée des Gastéropodes fut surtout étudiée par H. Delaunay. Cependant, Hasse, en 1910, trouvait des traces d'ammoniaque dans les excreta de l'Escargot de vigne. Au contraire, H. Delaunay et Myers ont trouvé une quantité plus importante. Myers, qui a étudié

le sang de *Cryptochiton stelleri*, trouve 0 mg. 50 p. 100 d'azote ammoniacal, et, pour *Haliotis rufescens*, 0 mg. 13.

H. Delaunay avait donné pour le sang d'*Helix* le chiffre de 0 mg. 2 p. 100. Plus tard, il approfondit mieux cette question et trouva que des Aplysies vivant dans de l'eau de mer excrétaient une quantité assez importante d'ammoniaque, 0 mg. 20 et 0 mg. 12 d'azote ammoniacal p. 100. De même, il trouve dans leurs liquides cavitaires de 0 mg. 18 à 0 mg. 67.

Les Gastéropodes excréteraient donc bien de l'ammoniaque.

Nous avons étudié surtout l'Escargot, Invertébré terrestre, et l'Aplysie, Invertébré marin.

Helix aspersa et *Helix pomatia.*

Le sang a été recueilli au niveau du cœur après incision du péricarde, l'animal étant débarrassé de sa coquille à cet endroit. Nous avons pris des animaux alimentés et d'autres à jeun. Voici les résultats que nous avons obtenus exprimés en γ d'azote ammoniacal pour 100 cm^3 :

Helix Aspersa :

Animaux à jeun : 1.050 et 1.000.
Animaux alimentés : 952, 888 et 933.

Helix pomatia :

Animaux alimentés : 250, 200 et 425.

Il semble que, chez les animaux à jeun, la teneur en ammoniaque du sang soit très légèrement supérieure à celle des animaux alimentés, mais la différence n'est pas aussi importante que nous pouvions le supposer. Ces animaux, en effet, évitent l'accumulation de l'ammoniaque en le transformant en acide urique, corps moins toxique. H. Delaunay était arrivé à cette conclusion, trouvant pendant la période d'hibernation une augmentation de l'acide urique.

Aplysia limacina et *Aplysia punctata.*

Les Aplysies provenaient du Bassin d'Arcachon. Elles étaient en parfait état lorsque nous les avons saignées. Nous avons recueilli le liquide cavitaire par ouverture de la cavité générale, avec des ciseaux.

Ci-dessous, nous donnons les chiffres obtenus exprimés en γ d'azote ammoniacal pour 100 cm³ :

							Moyenne
Aplysia limacima :	100	143	208	221	91	70	139
Aplysia punctata :	87	93	80	138			99

Le liquide cavitaire des Aplysies contient donc de l'ammoniaque, mais nous n'avons pas trouvé de chiffres aussi élevés que H. Delaunay. La teneur la plus forte étant de 221 γ pour 100 cm³.

Buccinum undatum.

Les Buccins ont été achetés au marché et laissés six heures dans l'eau de mer; leur poids étant de 210 grammes. Nous avons prélevé le sang comme celui de l'Escargot au niveau du cœur et après perforation du péricarde. Le sang devient bleu au contact de l'air, il contient, comme celui de l'Escargot, de l'hémocyanine.

Teneur en azote ammoniacal du sang, 763 γ pour 100 cm³. Ils excrètent leur ammoniaque puisque nous avons trouvé dans l'eau de mer dans laquelle nous les avions placés, 8 milligrammes d'azote ammoniacal pour 2 litres d'eau. Cette ammoniaque semblerait provenir de l'accumulation qui s'est produite pendant leur séjour à l'air.

VERTEBRES

Poissons.

A l'étude des Invertébrés, nous avons joint l'étude de quelques Poissons.

Nous avons étudié le Barbeau, Poisson téléostéen, et la Lamproie d'eau douce (de Planer, Lamprillon).

Ces animaux furent achetés à Bordeaux et laissés dans l'eau douce pendant vingt-quatre heures avant d'être sacrifiés. Le sang est prélevé par section de la queue au-dessous de l'orifice de la vessie; on introduit une fine canule dans l'aorte dorsale.

Voici les résultats trouvés en azote ammoniacal pour 100 cm³ de sang :

Barbus fluvialitis, 1.400 γ;
Petromyzon Planeri, 2.890 γ.

Plus particulièrement, nous avons étudié la Torpille sur place à la Station biologique d'Arcachon. Nous avons recherché l'ammoniaque dans divers liquides de leur organisme. Voici les résultats de nos recherches exprimés en γ d'azote ammoniacal pour 100 cm³.

Date	Sang	Urine	Bile	Liquide amniotique
Juillet 1934.	2.000	—	—	—
Oct. 1935 ..	2.083	3.200	71	285
— — ..	1.333	3.478	220	266

Les deux dernières Torpilles étaient à jeun et en gestation.

Après ouverture des deux utérus de la Torpille, nous avons pu extraire des Torpilles embryonnaires en parfait état, avec leur vésicule vitelline jaune, et qui, placées dans de l'eau de mer, ont continué à vivre très normalement.

Il nous a paru intéressant, possédant ce matériel d'étude, d'étudier l'excrétion ammoniacale de ces petites Torpilles dès leur naissance.

Pour cela, nous les avons divisées en deux lots que nous avons placés dans des cristallisoirs différents avec une quantité déterminée d'eau de mer. Nous avons, de plus, cherché si, au dernier stade de leur vie embryonnaire, leur vésicule vitelline jouait un rôle autre qu'un rôle de nutrition; pour cela, les animaux de l'un de nos cristallisoirs ont été privés de leur vésicule après ligature et section du funicule de cette dernière.

1° *Lot de Torpilles embryonnaires possédant encore leur vésicule et pesant au total* 120 *grammes* (trois animaux). — Placées dans 440 cm³ d'eau de mer, l'expérience a duré dix-huit heures à la température de 17° C. Pour les dosages, les liquides ont été désalbuminés par l'acide sulfurique et le tungstate de sodium.

2° *Lot de Torpilles embryonnaires sans vésicule pesant* 120 *grammes en tout* (quatre animaux). — Placées dans 350 cm³ d'eau de mer, l'expérience a duré dix-sept heures à la température de 16° C. L'eau est, dans cette expérience aussi, désalbuminée.

Dans ces deux cas, nous avons étudié : l'azote total, l'azote ammoniacal, l'azote aminé et l'azote hypobromite.

Résultats :

	N ammoniacal	N hypobromite	N aminé	N total
Lot 1°	1 mg. 500	18 mg. 172	Néant	18 mg. 480
Lot 2°	1 mg. 400	18 mg. 620	Néant	25 mg. 725

Ces chiffres sont exprimés en milligrammes d'azote éliminé p. 100.

Nous constatons qu'à la fin de leur vie embryonnaire les Torpilles excrètent beaucoup d'ammoniaque, et les chiffres trouvés ici sont du même ordre de grandeur que chez l'animal adulte.

D'autre part, la très grande quantité d'azote total trouvé pour les Torpilles du second lot (sans vésicule) semble indi-

quer qu'une partie de l'azote de déchet n'a pas été entièrement transformé comme chez l'animal complet à ce stade.

*
* *

Le sang des Poissons contient une quantité d'azote ammoniacal supérieure à celle des Invertébrés.

A côté de ces résultats, il nous a paru utile, afin d'avoir un terme de comparaison, de rechercher les chiffres donnés par les auteurs, de la concentration en azote ammoniacal du sang des Vertébrés supérieurs; et d'autre part, d'effectuer avec notre méthode quelques-unes de ces recherches.

En 1921, Nash et Bénédict ont trouvé que le sang des Vertébrés supérieurs contenait 100 γ d'azote ammoniacal. Quelques années après, Fontès et Yovanovitch ont mis en doute l'existence de l'ammoniaque dans le sang, mais récemment Teorell et Folin ont donné comme chiffres limites de 75 γ à 170 γ d'azote ammoniacal pour 100 cm³ de sang humain.

Après une série de dosages chez le Lapin, nous nous sommes arrêté au chiffre moyen de 100 γ d'azote ammoniacal pour 100 cm³ de sang total.

*
* *

Nous avons réuni dans le tableau qui suit, pour les différentes espèces animales étudiées, les chiffres inférieurs, supérieurs et moyens que nous ont donnés nos expériences.

Espèces animales	Chiffre inférieur pour 100 cm³	Chiffre supérieur pour 100 cm³	Chiffre moyen pour 100 cm³
Asterias rubens	104	356	228
Paracentrotus lividus	96	216	120
Arenicola piscatorum	—	—	396
Sipunculus nudus :			
Sang total	106	664	400
Plasma	290	1.140	560
Maja squinado :			
Sang	266	1.210	692
Urine	100	500	272
Cancer pagurus :			
Sang	450	680	565
Urine	—	—	800
Carcinus mœnas :			
Sang (vivant dans l'eau).	666	1.250	943
Sang (vivant dans l'air).	1,070	2.152	1,588
Astacus fluviatilis	650	800	715
Neprops norvegicus	—	—	923
Homarus vulgaris	1,135	1,175	1,153
Mya arenaria :			
Sang	100	333	232
Liquide intervalvaire ...	147	235	195
Gryphea angulata	250	325	285
Mytilus edulis :			
Sang	—	—	928
Liquide intervalvaire ...	—	—	362
Sepia officinalis :			
Sang	430	3.846	1.418
Urine	64,510	138.875	103,880
Liquide gastrique	8,625	13.875	10,420
Noir	29,412	44.718	37,045
Helix aspersa :			
à jeun	1,000	1,050	1,025
Alimenté	888	952	924
Helix pomatia	200	425	292
Aplysia limacina	70	221	139
Aplysia punctata	80	138	99
Buccinum undatum	—	—	763
POISSONS			
Barbus fluviatilis	—	—	1,604
Petromïzon Planeri	—	—	2.890
Torpedo marmorata :			
Sang	1,333	2,083	1,805
Urine	3,200	3,478	3,320
Bile	71	220	145
Liquide amniotique	—	—	266
MAMMIFÈRES			
Lepus cuniculus	—	—	100

CHAPITRE IV

ETUDE EXPERIMENTALE DE L'INTOXICATION AMMONIACALE

Jusqu'à présent, nous avons étudié la façon dont se comportait un certain nombre d'Invertébrés placés dans leur milieu habituel et dans des conditions normales d'existence. Les chiffres d'azote ammoniacal trouvés, soit dans le sang, soit dans le liquide cavitaire, nous paraissent être des chiffres normaux pour ces Invertébrés.

Nos travaux à Arcachon sur des animaux sortant juste de leur milieu au moment où ils entraient en expérience et de plus les techniques de dosage que nous avons employées nous permettent de dire que nous nous sommes placée dans les conditions optima pour obtenir des chiffres les plus voisins de la réalité.

Cette dose physiologique normale d'azote ammoniacal du liquide cavitaire d'un certain nombre d'Invertébrés étant déterminée, nous avons cherché à savoir comment se comportaient ces animaux lorsqu'ils se trouvaient dans un milieu extérieur riche en ammoniaque et semblable dans tous ses autres éléments, c'est-à-dire la température, le pH, l'oxygène, et la concentration en éléments minéraux; et comment ils se comportaient lorsque leur milieu intérieur était à son tour très riche en azote ammoniacal. Dans ce chapitre, nous avons étudié deux choses :

1° la variation du milieu intérieur de l'animal quand la teneur en azote ammoniacal du milieu extérieur augmente;

2° la variation du milieu extérieur quand la concentration de l'azote ammoniacal est élevée dans le milieu intérieur.

Ce que nous avons voulu observer, c'est la façon et la forme du passage d'un milieu à l'autre de l'azote ammoniacal et la vérification du fonctionnement de l'appareil excréteur de ces différents animaux, considéré comme une membrane semi-perméable laissant passer certains ions. D'autre part nous avons essayé de déterminer si ces animaux possédaient un système de régulation limitant leur concentration interne en azote ammoniacal et si ces organes excréteurs faisaient une sélection en empêchant le passage de l'ammoniaque du milieu extérieur vers le milieu intérieur.

Dans ce but, nous avons étudié les animaux suivants :

— parmi les Crustacés : la Maja et le Crabe;
— parmi les Mollusques Gastéropodes : l'Aplysie,
— et, parmi les Vers : le Siponcle.

Maja squinado.

La Maja est un des Crustacés les plus faciles à se procurer à Arcachon. Il a l'avantage, pour nous, de se prêter assez bien aux expériences, sa grande vitalité permet de lui prendre 20 cm^3 d'hémolymphe sans craindre de voir mourir l'animal.

Nous avons vu dans le tableau précédent que la teneur en azote ammoniacal du liquide cavitaire pouvait varier de 210 à 1.210 γ, le chiffre moyen étant fixé à 736 γ. Nous avons alors injecté de l'ammoniaque sous forme salifiée et nous avons étudié le comportement de l'animal et l'élimination dans le milieu extérieur.

Nous avons suivi les indications que donne Bialaszewiez (1932) pour faire les injections ainsi que les prises de sang.

Techniques.

1° *Injection.* — La Maja est placée sur le dos, sur la table ou mieux sur les bords de cylindre en verre de hauteur appropriée afin que l'animal ne puisse pas toucher la surface de la

table du bout de ses membres. A l'aide d'une aiguille et d'une seringue, on fait l'injection à la base de la dernière articulation d'une des dernières pattes, on perce la fine membrane chitineuse et on introduit l'aiguille dans le corps de la Maja. Les injections doivent être faites assez lentement, la Maja s'agite, dans quelques cas il y a autonomie, mais cela est sans inconvénients.

2° *Prise de sang.* — Bialaszewiez a donné également une méthode simple pour faire plusieurs prises de sang sur le même animal. Ce qu'il a fait sur le Crabe, nous l'avons fait sur la Maja et nous avons obtenu de très bons résultats. La Maja est maintenue sur le dos au bord de la table. On coupe rapidement au ciseau l'extrémité du dernier segment de la dernière patte. On immobilise le membre en position verticale vers le bas de façon à ce que le sang s'écoule goutte à goutte, on le recueille dans une petite capsule ou récipient propre, et lorsque l'on en a environ 10 cm³, on retourne le membre vers le haut et on ferme la plaie avec un tampon de cire blanche que l'on fait fondre sur les bords de son contact avec la chitine, à l'aide d'un agitateur préalablement chauffé. La cire durcit et bouche l'orifice, le sang ne coule plus, et la Maja remise dans l'eau de mer continue à vivre. Quelques heures après, on peut faire une nouvelle prise de sang, il suffit d'enlever la cire à l'aide d'une pince et de mettre la patte en position verticale vers le bas; on recueille à nouveau le sang et on referme comme précédemment. On peut répéter cette opération plusieurs fois.

Pour faire nos injections, nous avons utilisé une solution de chlorhydrate d'ammonium à 3 g. 821 de ce sel pour 100 cm³ d'eau de mer (l'eau de mer étant isotonique au liquide cavitaire), donc 1 cm³ de cette solution contient 10 milligrammes d'azote ammoniacal.

Nos expériences ont été faites au mois de septembre 1935 à Arcachon.

Expérience I.

La Maja I sortant des bassins de la Station en parfait état est saignée avant l'injection.

Teneur en azote ammoniacal du sang : 635 γ.

Dose normale comme nous l'avons signalé plus haut.

Nous injectons à la Maja 1 cm³ de la solution de chlorydrate d'ammonium, soit 10 milligrammes d'azote ammoniacal. Nous la mettons dans un cristallisoir avec deux litres d'eau de mer.

Six heures après, nous dosons la teneur en azote ammoniacal de l'eau de mer qui ne présentait au début que de très faibles traces d'ammoniaque.

Teneur en azote ammoniacal de l'eau de mer : 444 γ p. 100,
soit, pour 2.000 cm³ d'eau, 8 mg. 888.

La Maja I a donc éliminé en six heures les 9/10 de l'azote ammoniacal injecté.

Expérience II.

Une autre Maja est retirée des bassins. La teneur en azote ammoniacal de son sang est de 700 γ.

Nous lui injectons 2 cm³ de la solution A, soit 20 milligrammes d'azote ammoniacal, et nous la mettons dans un cristallisoir avec seulement 1.300 cm³ d'eau de mer.

Six heures après l'eau contient :

1.143 γ d'azote ammoniacal pour 100 cm³,
soit 14 mg. 86 pour 1.300 cm³.

La Maja a donc rejeté en six heures de temps 14 mg. 86, soit les 3/4 de l'azote ammoniacal qui lui avait été injecté.

Pourquoi, dans le premier cas, les 9/10 furent éliminés, et, dans ce deuxième cas, les 3/4 seulement ? Comme nous allons le voir dans les expériences suivantes, si la quantité d'eau de mer avait été plus grande, l'élimination aurait été presque totale comme dans le premier cas,

Expérience III.

Prenons une troisième Maja et injectons-lui 50 milligrammes d'azote ammoniacal. Après convulsions, nous la laissons cinq minutes au repos pour donner le temps au liquide injecté de diffuser dans tout l'animal. Au bout de ce temps, nous lui prélevons 4 cm³ de sang. Nous trouvons alors que la teneur en azote ammoniacal du sang est passée de la normale : 0 mg. 725, à 2 mg. 500 p. 100. Nous avons prélevé l'urine en même temps, et nous trouvons une teneur en azote ammoniacal p. 100 de 0 mg. 500, chiffre au-dessus de la normale.

La Maja est mise dans un cristallisoir avec 2.000 cm³ d'eau de mer.

Une heure après, la teneur de l'eau de mer est de 1 mg. 500 d'azote ammoniacal pour 100 cm³, soit 30 milligrammes pour la totalité de l'eau.

L'eau est renouvelée. Trois heures après, nous trouvons que cette eau contient beaucoup d'ammoniaque, soit 21 milligrammes pour les 2.000 cm³.

Pour le sang, nous trouvons 0 mg. 534 en azote ammoniacal, et, pour l'urine, 0 mg. 175 p. 100.

La Maja s'étant intoxiquée par la suite en rejetant son contenu gastrique dans l'eau de mer, nous n'avons pu continuer notre expérience. Cependant, nous pouvons conclure que la Maja a rejeté en moins de quatre heures l'ammoniaque que nous lui avons injectée. Elle en rejette même un petit peu plus, cet excès provient sans doute du sang puisqu'à la fin de l'expérience nous trouvons une teneur en azote ammoniacal inférieure à celle du début.

Expérience IV.

A une Maja de 450 grammes, nous avons injecté 50 milligrammes d'azote ammoniacal. Nous avons constaté une vive agitation de l'animal, puis, dix minutes après, la mort survient. Cette dose d'ammoniaque paraît être une dose limite pour ces animaux.

Expérience V.

La Maja que nous avons prise pour cette expérience pesait 710 grammes; elle était donc plus grosse que la précédente, afin de la voir survivre à une injection de 50 milligrammes d'azote ammoniacal. Aussitôt après la piqûre, elle présente des convulsions, mais, mise dans un grand cristallisoir avec 6 litres d'eau de mer, elle reprend son activité normale.

Deux heures après l'injection, nous avons retrouvé 43 milligrammes d'azote ammoniacal dans la totalité de l'eau de mer, alors que dans le sang nous n'avons trouvé que 0 mg. 800 d'azote aammoniacal pour 100 cm³.

Nous changeons l'animal d'eau, et trois heures après nous dosons à nouveau l'ammoniaque qu'il a pu rejeter. Nous trouvons alors 9 mg. 600 d'azote ammoniacal éliminé pendant ces trois heures. Nous faisons un dosage dans le sang, la teneur est tombée à 0 mg. 277 pour 100 cm³ de liquide cavitaire.

Nous avons renouvelé l'eau de mer et nous avons laissé la Maja, qui ne paraît nullement fatiguée de son intoxication. Au bout de trois heures, l'eau ne contient plus que 0 mg. 500 d'azote ammoniacal; c'est la quantité d'ammoniaque que peut rejeter une Maja à l'état normal dans ce même temps.

Conclusion. — Cette dernière expérience confirme les résultats déjà obtenus : la Maja élimine très rapidement l'ammoniaque qu'on lui injecte si elle a, à sa disposition, une quantité d'eau suffisante. L'ammoniaque n'est donc pas pour elle un aliment, c'est au contraire un corps toxique dont elle cherche à se débarrasser le plus rapidement possible, alors que d'autres substances, en particulier le glucose, injectées dans les mêmes conditions, n'ont pas été éliminées (expérience que nous avons faite avec le Professeur Delaunay). Morgulis ayant injecté du sulfate d'ammonium à *Palinurus Argus*, a trouvé lui aussi que cette substance passait aussitôt dans le sang et qu'elle était très rapidement excrétée; en moins de deux heures, elle est complètement éliminée.

De plus, nous voyons que ces animaux résistent à une assez forte quantité d'ammoniaque puisque nous avons pu aller jusqu'à 50 milligrammes d'azote ammoniacal en injection. Au-delà de cette dose, l'animal a succombé presque immédiatement. Si nous considérons l'expérience IV, la dose de 50 milligrammes d'azote ammoniacal a été mortelle pour un animal de 400 grammes, si nous rapportons au kilogramme d'animal, nous trouvons le chiffre de 123 milligrammes, quantité beaucoup plus forte que celle indiquée pour les Vertébrés. Dans le *Dictionnaire de Physiologie* de Charles Richet, nous trouvons, en effet, à l'article ammoniaque que, d'après les expériences de Bouchart et Tapret, la dose convulsivante de sels ammoniacaux est de 32 milligrammes d'azote ammoniacal, et la dose mortelle de 90 milligrammes par kilogramme d'animal en injection intraveineuse. Mlle Moissonnier confirme ces doses, et, pour elle, les seuils de toxicité ont toujours été voisins de 25 à 35 milligrammes pour la dose convulsivante et 70 pour la dose mortelle.

Carcinus moenas.

Comme la Maja, le Crabe, bien que beaucoup plus petit, se montre très résistant. Il nous a permis de faire de nombreuses expériences au Laboratoire de chimie biologique de la Faculté. Nous avons reçu d'Arcachon des lots de petits Crabes que nous avons mis, dès réception, dans de grands cristallisoirs remplis d'eau de mer.

N'étant pas ainsi limité par le temps, nous avons pu étudier l'élimination d'ammoniaque par ces animaux sans faire d'injection et voir quelle était la dose d'ammoniaque qu'ils pouvaient supporter sans avoir besoin de renouveler l'eau de mer (l'oxygène étant en quantité suffisante par suite de la grande surface du récipient). Nous avons cherché quelle était cette dose létale d'ammoniaque en renouvelant l'expérience de Florence sur les Poissons blancs. Enfin, nous avons étudié l'intoxication par un sel ammoniacal, le chlorhydrate d'ammonium mis dans l'eau de mer.

1° Examinons le premier point : que se passe-t-il lorsque nous laissons des Crabes séjourner dans une quantité déterminée d'eau de mer ?

En juin 1934, nous avons pris deux lots de Crabes, l'un d'un poids total de 285 grammes, l'autre de 300 grammes. La température du laboratoire était à ce moment-là de 23° C. Dans chacun des cristallisoirs où se trouvent les Crabes, nous avons 600 cm³ d'eau de mer ne contenant que des traces d'ammoniaque.

Nous avons dosé l'ammoniaque de l'eau de mer au bout de trois heures, six heures et neuf heures, et ensuite nous avons sacrifié deux animaux dans chaque lot. Voici les chiffres obtenus en γ d'azote ammoniacal pour 100 centimètres cubes :

	Après 3 heures	Après 6 heures	Après 9 heures	Sang
Lot I.....	112	192	225	910
Lot II.....	114	160	195	1.023

Les Crabes éliminent bien l'ammoniaque qui se trouve dans leur organisme comme déchet.

En janvier 1933, nous avons repris ces expériences de 12 à 15° C.

Le lot III contenait 402 grammes de Crabe dans 1.100 cm³ d'eau de mer. Le lot IV, 270 grammes de Crabe dans 800 cm³.

	Après 3 heures	Après 6 heures	Après 24 heures	Rapporté à 100 g. de crabe en 24 heures
Lot III.....	—	—	1.225	3.327
Lot IV.....	213	400	1 100	3.300

Après avoir vécu dix-huit heures dans la même eau de mer, le sang de Crabe avait une teneur en azote ammoniacal de 1.111 γ exprimée toujours pour 100 cm³ de liquide cavitaire.

Après trente heures, nous avons trouvé 1.195 γ;

Après cinquante-six heures, nous avons trouvé 1230 γ.

En mars 1933, un cinquième lot de Crabes est mis dans 1.000 cm³ d'eau de mer et laissé dans cette même eau pen-

dant cent soixante-quatre heures. Au début, nous prélevions 10 cm³ d'eau de mer pour faire notre dosage que nous remplacions par 10 cm³ d'eau de mer nouvelle; mais, à la fin, il suffisait de prendre 2 cm³ d'eau. Voici, dans le tableau suivant, les différents chiffres obtenus :

Prélèvements	Teneur en N (NH^3) pour 100 cm³ d'eau	Elimination rapportée à 100 g. de Crabe
Après 2 heures.....	153	463
Après 5 heures.....	266	808
Après 8 heures.....	350	1 060
Après 10 heures.....	543	1.646
Après 26 heures.....	588	1.782
Après 44 heures.....	750	2.275
Après 68 heures.....	1.666	5.050
Après 74 heures.....	1.850	5.606
Après 116 heures.....	2.500	7.575
Après 122 heures.....	2.941	8 912
Après 146 heures.....	3.571	10.821
Après 164 heures.....	3.906	11.834

A ce moment-là, nous avons saigné deux Crabes. La teneur en azote ammoniacal du sang est alors de 1 mg. 515 et 1 mg. 333 pour 100 cm³.

Les autres Crabes continuent à vivre dans cette eau. Six jours après, nous analysons le sang d'un autre Crabe; le taux d'ammoniaque est passé à 3 mg. 472 d'azote ammoniacal pour 100 cm³. Enfin, dix jours plus tard, nous trouvons 7 mg. 900.

Nous voyons donc que les Crabes se montrent très résistants vis-à-vis de l'ammoniaque qu'ils excrètent. Ils sont capables d'en accumuler beaucoup dans leur sang sans présenter de troubles graves d'intoxication. On pourrait expliquer ce fait en disant que l'ammoniaque en excès serait neutralisée par le gaz carbonique. Bohn, en 1899, nous dit au sujet des Crabes vivant dans les fonds coralligènes, et par conséquent en milieu ammoniacal : « ...il est vrai qu'ils en atténuent les effets toxiques en absorbant de l'acide carbonique. Il semble que, chez ces Crustacés, l'excrétion de CO^2 ne se fasse pas au dehors, afin de neutraliser dans le sang et les tissus l'ammoniaque qui y pénètre, le résultat de cette neutralisation du milieu intérieur doit être la formation de carbonate d'ammonium en grande abondance ».

2° A la suite de ces expériences nous montrant que les Crabes peuvent vivre dans un milieu assez riche en ammoniaque et en accumuler dans leur organisme, nous avons essayé de déterminer la dose létale d'azote ammoniacal pour ces animaux. Pour cela, nous nous sommes inspirée des expériences d'Hugounenc et Florence sur les Poissons blancs, afin d'être sûre que l'intoxication soit due à l'ammoniaque.

Dans deux cristallisoirs A et B, nous avons mis la même quantité d'eau de mer (200 cm³ d'eau de mer) et la même quantité d'urée (1 gramme). Dans le cristallisoir B, nous avons ajouté 5 cm³ d'une solution d'uréase à 4 p. 100 dans le phosphate acide de sodium. Nous prenons un troisième cristallisoir avec 200 cm³ d'eau de mer et 5 cm³ de la solution d'uréase. Trois Crabes de même poids sont mis dans chacun des trois cristallisoirs. Au bout d'une demi-heure, on voit le Crabe de B manifester de l'agitation, il devient méchant, alors que les deux autres ne présentent aucun trouble d'intoxication. Nous constatons que le pH dans A et C ne change pas, alors qu'il s'élève progressivement dans B. Nous pouvons dire, comme Florence, que « la mort de l'animal doit donc être due à l'ammoniaque formée par l'hydrolyse de l'urée sous l'influence de l'uréase ».

Expérience I.

Crabe : 48 grammes.

Température de l'eau de mer : 12° C.

pH : 6,5.

Une heure et demie après, le Crabe meurt après être passé par la phase de convulsions. Immédiatement, nous dosons l'ammoniaque contenue dans l'eau de mer et dans le sang de Crabe.

Eau du cristallisoir : 25 milligrammes d'azote ammoniacal pour 100 cm³.

Sang du Crabe : 12 mg. 500.

pH de l'eau : 8,4.

Expérience II.

Crabe : 68 grammes.

Température de l'eau de mer : 14° C.

pH . 6,5.

Trente-cinq minutes après, le Crabe commence à avoir des convulsions, et une heure après le Crabe meurt.

Eau du cristallisoir : 25 mg. 3 d'azote ammoniacal p. 100.

Sang du Crabe : 8 mg. 2.

pH de l'eau : 8,5.

Expérience III.

Crabe : 45 grammes.

Température de l'eau de mer : 16° C.

pH : 6,5.

Trente minutes après, le pH de l'eau de mer est déjà à 8,3, la solution commence à être trouble. Ce n'est qu'au bout de deux heures que le Crabe meurt.

Eau du cristallisoir : 19 mg. 800 d'azote ammoniacal p. 100.

Sang du Crabe : 9 mg. 370.

pH de l'eau : 8,5.

Conclusions. — La dose toxique paraît être assez élevée, elle est comprise entre 200 et 250 milligrammes par litre d'eau de mer, alors que Florence a trouvé qu'elle était de 70 milligrammes pour les poissons blancs.

L'alcalinité de la solution augmentant, nous nous sommes demandé si la mort des Crabes devait bien être imputée à l'ammoniaque. Nous avons pris deux Crabes de 60 grammes et nous les avons mis dans deux cristallisoirs distincts avec la même quantité d'eau de mer. Dans l'un, nous avons ajouté de la lessive de soude et dans l'autre de la solution au 1/10 d'ammoniaque, de façon à obtenir un pH de 8,5 à 9 dans les deux cristallisoirs. Cette alcalinité, du reste, est neutralisée par les Crabes; aussi, pour maintenir ce pH,

avons-nous été obligée d'ajouter quelques gouttes de solution alcaline correspondante.

Au bout de dix heures, le Crabe est malade dans le cristallisoir à ammoniaque et ne tarde pas à succomber alors que l'autre Crabe se porte très bien.

Nous avons dosé l'ammoniaque de l'eau de mer et du sang de ces Crabes :

Eau de mer : 12 mg. 130 d'azote ammoniacal pour 100 cm^3.

Sang : 5 mg. 555 d'azote ammoniacal pour 100 cm^3.

Donc le pH n'influe pas sur la vie du Crabe, seule la base ammonium entre en jeu, et nous voyons en plus que, pour un pH plus élevé, l'ammoniaque est plus toxique.

M. Duval avait déjà constaté la grande toxicité de l'ammoniaque à un pH élevé, et la durée de survie des Poissons blancs dans ce cas est très faible pour un pH de 9.

3° Après avoir vu qu'un pH de 9 n'est pas toxique en milieu sodique, alors qu'il est toxique en milieu ammoniacal, nous avons travaillé à un pH plus normal de 6,8 à 7 en additionnant simplement l'eau de mer de chlorhydrate d'ammonium.

Nous avons fait une solution de ce sel à 3 g. 831 pour 100 cm^3 dont 1 cm^3 correspond à 10 milligrammes d'azote ammoniacal.

Dans trois cristallisoirs, nous avons mis 300 cm^3 d'eau de mer. Dans le premier, nous avons ajouté 1 cm^3 de solution de chlorhydrate d'ammonium; dans le second, 5 cm^3, et, dans le troisième, 10 cm^3. Nous avons donc, pour 100 cm^3, les doses suivantes d'azote ammoniacal : 3 mg. 333, 16 mg. 665, 33 mg. 333.

Nous mettons un Crabe de 45 grammes dans chaque récipient. Les Crabes 1 et 2 se portent bien; ils ont vécu six jours dans cette même eau sans présenter de troubles d'intoxication. Au contraire, le troisième devient méchant, les pattes postérieures se raidissent, le crabe meurt quelques heures après.

L'azote ammoniacal de l'eau du cristallisoir est alors dosé. Nous avons trouvé 31 mg. 250 pour 100 cm^3 et dans le sang 12 milligrammes.

Un autre Crabe de 57 grammes, mis dans les mêmes conditions, mais avec une dose d'azote ammoniacal de 50 milligrammes pour 100 cm^3, meurt assez rapidement après être passé par la période d'excitation.

Comme pour les Vertébrés, les sels ammoniacaux sont donc des convulsivants pour les Crustacés.

De l'étude de l'intoxication expérimentale chez le Crabe, il ressort que ces animaux sont capables d'accumuler de grandes quantités d'ammoniaque dans leur sang sans présenter de troubles graves, ce qui permet d'expliquer en partie leur vie en dehors de l'eau de mer et leur résistance aux changements brusques de leur condition d'existence, en particulier dans leur transport, sans précautions spéciales, soit pour des recherches scientifiques, comme c'est le cas dans ce travail; soit pour l'alimentation, ce qui est le cas le plus général.

La dose d'azote ammoniacal dans leur sang ne devient toxique qu'à partir de 10 milligrammes.

Pour un pH de 7, ils peuvent vivre dans de l'eau de mer chargée d'ammoniaque à 33 milligrammes p. 100, mais pour un pH de 9 ce chiffre s'abaisse à 12 milligrammes.

Aplysia limacina.

Après avoir remarqué la résistance des Crustacés à l'ammoniaque, nous avons étudié les Gastéropodes, et notamment l'Aplysie, que nous avons pu avoir facilement à Arcachon. Il n'y a pas, à notre connaissance du moins, de travaux faits sur la résistance des Aplysies à l'ammoniaque.

Nous avons injecté à plusieurs lots de ces animaux des doses d'azote ammoniacal différentes, et nous avons dosé à différents moments de la journée la quantité d'ammoniaque qui se trouvait dans l'eau de mer et le liquide cavitaire.

Les animaux aussitôt amenés au laboratoire sont débarrassés des herbes et des algues qui les entourent et lavés dans de l'eau de mer. Mis sur la planche de liège, on leur fait l'injection à la partie antérieure de leur face ventrale, l'aiguille étant enfoncée obliquement pour ne pas faire l'injection dans le tube digestif, mais bien dans la cavité générale.

Après l'injection, l'animal se contracte et referme ainsi l'endroit de la piqûre. Nous avons lavé l'Aplysie dans l'eau de mer pour enlever les traces d'ammoniaque qui pouvaient se trouver sur le corps. En général, les Aplysies secrètent un liquide violet qui souille l'eau des cristallisoirs dans lesquels elles se trouvent; il faut alors les laisser tranquilles quelques minutes et les mettre dans des cristallisoirs propres avec une quantité connue d'eau de mer.

Les injections furent faites avec la même solution de chlorhydrate d'ammonium dans l'eau de mer que pour les Maja, c'est-à-dire contenant 10 milligrammes d'azote ammoniacal par centimètre cube.

Expérience I.

Injection de 100 γ d'azote ammoniacal.

Les Aplysies sont injectées à 100 γ d'azote ammoniacal et mises après lavage dans 900 cm^3 d'eau de mer.

Six Aplysies non injectées et servant de témoin sont mises en même temps dans la même quantité d'eau de mer.

Trois heures après, nous prélevons de l'eau de mer des cristallisoirs où ont vécu les Aplysies. Nous en trouvons très peu dans l'eau des premières : 14 γ pour 100 cm^3, soit 126 γ au total; alors que l'eau de mer des Aplysies témoins n'en contient que des traces infimes.

Le liquide cavitaire de trois Aplysies sacrifiées dans le premier cas donne 344 γ d'azote ammoniacal pour 100 cm^3, tandis que le liquide cavitaire de trois Aplysies témoins ne contient que 113 γ pour 100 cm^3.

Les trois Aplysies restantes de chaque lot sont mises dans de l'eau de mer fraîche (450 cm³). Douze heures après l'injection, nous constatons que l'eau de mer ne contient dans les deux cristallisoirs que des traces d'ammoniaque et que la teneur des liquides cavitaires est toujours sensiblement la même.

Les Aplysies ont donc gardé presque tout l'ammoniaque injecté : ceci ne nous a pas étonné, nous avons vu, en effet, dans le chapitre III, que la teneur en azote ammoniacal du liquide cavitaire variait de 70 à 221 γ pour 100 cm³. La faible quantité d'ammoniaque injectée dans le liquide cavitaire n'a donc pas été toxique, puisque ces animaux vivent avec un liquide cavitaire dont la teneur en ammoniaque peut être du même ordre de grandeur.

D'autres expériences faites avec le faibles doses d'azote ammoniacal ont confirmé ces résultats. Aussi avons-nous fait des expériences avec des doses plus élevées.

Expérience II.

Injection de 1 milligramme d'azote ammoniacal.

Le 24 septembre 1935, nous avons injecté à trois Aplysies 1 milligramme d'azote ammoniacal et nous les avons mises dans 600 cm³ d'eau de mer. Toujours en même temps, nous avons mis trois Aplysies témoins dans exactement la même quantité d'eau de mer.

Après trois heures, l'azote ammoniacal de l'eau de mer des deux lots d'Aplysies est dosé. Pour les Aplysies témoins, nous ne trouvons toujours que de faibles traces d'azote ammoniacal dans l'eau de mer où elles ont vécu, tandis que pour les autres nous trouvons alors 2 milligrammes pour les 600 cm³ d'eau de mer. Nous renouvelons l'eau; trois heures après, nous trouvons que les Aplysies ont rejeté très peu d'ammoniaque : dans le premier cas, 250 γ pour 600 cm³, et, pour les témoins, nous ne retrouvons toujours que de faibles traces. De nouveau l'eau est changée, et, douze heu-

res après l'injection, nous sacrifions les Aplysies. La teneur du liquide cavitaire est alors de 175 γ pour 100 cm³ pour celles qui ont été injectées, et seulement de 122 γ pour les témoins. Dans l'eau de mer de cette période, nous avons trouvé, pour les Aplysies injectées, 330 γ jour 100 cm³.

Les Aplysies semblent donc se débarrasser assez rapidement de l'ammoniaque que nous leur avons injectée.

Expérience III.

Injection de 2 milligrammes d'azote ammoniacal.

Le 26 septembre, nous avons injecté d'autres animaux à la dose de 2 milligrammes d'azote ammoniacal par Aplysies. Nous avons toujours pris un lot de trois Aplysies dans 600 cm³ d'eau de mer.

Deux heures après, l'eau de mer des Aplysies injectées contient 3 milligrammes d'azote ammoniacal pour 600 cm³; nous renouvelons l'eau de mer trois heures après, et, deux heures après, nous trouvons qu'elle en contient 1 mg. 630. De nouveau, l'eau est changée, et, trois heures après, elle en contient 1 mg. 350.

Nous saignons une Aplysie; son liquide cavitaire a une teneur de 150 γ d'azote ammoniacal pour 100 cm³. Les deux Aplysies restantes sont mises dans 500 cm³ d'eau de mer fraîche et laissées encore trois heures. Au bout de ce temps, nous constatons que les Aplysies n'ont plus rejeté d'ammoniaque.

Dans cette expérience, les Aplysies ont éliminé intégralement l'ammoniaque injecté.

Expérience IV.

Injection de 5 milligrammes d'azote ammoniacal.

Une grosse Aplysie a été injectée avec 5 milligrammes d'azote ammoniacal, et nous l'avons mise dans 600 cm³ d'eau de mer. Deux heures après, l'eau de mer contient 3 milligrammes d'azote

ammoniacal. Cette eau chargée en ammoniaque, est remplacée par de l'eau de mer fraîche. Deux heures après, cette eau contient 1 mg. 600 d'azote ammoniacal; nous changeons l'eau, et, deux heures après, elle n'en contient plus que 330 γ.

L'animal est alors sacrifié; le liquide cavitaire contient 208 γ pour 100 cm³.

L'Aplysie a éliminé très rapidement l'ammoniaque que nous lui avons injectée parce qu'elle avait à sa disposition une grande quantité d'eau de mer.

Expérience V.

Dans cette expérience, nous avons voulu déterminer la dose mortelle d'ammoniaque pour ces animaux.

Dans quatre cristallisoirs contenant chacun 600 cm³ d'eau de mer, nous avons mis des Aplysies que nous avons injectées à 17 heures. A 18 heures, nous avons fait un premier dosage de l'eau de mer que nous avons renouvelée; à 22 heures, nous sommes venue voir l'état des animaux, et nous avons dosé l'azote ammoniacal du liquide cavitaire et de l'eau de mer.

Le tableau suivant résume cette expérience.

Temps	Liquides analysés	Lot I Injection : 5 mg. Total : 15 mg.	Lot II Injection : 7 mg. 5 Total : 22 mg. 5	Lot III Injection : 10 mg. Total ; 30 mg.	Lot IV Injection : 15 mg.
17 heures.	—	Normal	Crache un peu violet	Contractions. Crache violet.	Contractions Crache violet.
18 heures.	Eau de mer.	2 mg. 250	5 mg. 625	7 mg. 500	Morte.
22 heures.	Eau de mer.	4 mg. 500	6 mg. 250	6 mg. 575	—
22 heures.	Liquide cavitaire	1 mg. 442	1 mg 875	4 mg. 166	—

Les Aplysies étaient toutes mortes à 22 heures.

1° De ce tableau, nous voyons que les Aplysies ont éliminé dans la première heure, le quart environ de l'ammoniaque qui leur avait été injectée;

2° Nous voyons que ces animaux sont peu résistants à l'ammoniaque, puisqu'ils n'ont pu vivre dans une eau chargée d'une quantité relativement faible d'ammoniaque;

3° La dose de 15 milligrammes semble être la dose mortelle pour une Aplysie de taille moyenne.

Conclusions. — L'ammoniaque est encore pour l'Aplysie un produit toxique dont elle cherche à se débarrasser le plus rapidement possible.

Sipunculus nudus.

Enfin, nous avons fait quelques expériences d'intoxication chez les Siponcles.

Nous leur avons injecté, comme à la Maja et à l'Aplysie, la solution de chlorhydrate d'ammoniaque dans l'eau de mer, dont 1 cm^3 correspond à 10 milligrammes d'azote ammoniacal.

L'injection a été faite au niveau de la tête sur la ligne médiane et en enfonçant délicatement l'aiguille, pour ne pas faire l'injection dans le tube digestif.

Trois Siponcles sont injectés chacun avec 5 milligrammes d'azote ammoniacal et mis dans 400 cm^3 d'eau de mer.

Deux autres sont injectés à 10 milligrammes et mis dans 200 cm^3 d'eau de mer.

Enfin, deux Siponcles témoins sont mis dans 200 cm^3 d'eau de mer.

Voici, dans le tableau suivant, les résultats obtenus exprimés en milligrammes d'azote ammoniacal et rapportés au volume total pour l'eau de mer et pour 100 cm^3 pour le liquide cavitaire :

Temps	Liquide	Injection ; 5 mg. Total : 15 mg.	Injection ; 10 mg. Total : 20 mg	Non injectés.
2 heures après.	Eau de mer.	3 mg. 716	4 mg. 166	Traces
24 heures après.	Eau de mer.	9 mg. 088	7 mg. 692	0 mg. 040
24 heures après.	Liquide cavitaire	0 mg. 830	3 mg. 571	0 mg. 490

Lorsque nous avons saigné les Siponcles, ils commençaient à être incommodés. Néanmoins, ils se montrent très résistants puisqu'ils peuvent vivre dans une eau de mer contenant plus de 3 milligrammes d'azote ammoniacal pour 100 cm³, en même temps que leur sang contient une dose très élevée d'azote ammoniacal, 3 mg. 571 pour 100 cm³, alors que d'habitude elle n'est que de 0 mg. 500.

Dans une autre expérience, nous avons injecté la même quantité d'azote ammoniacal et nous avons augmenté le volume d'eau de mer; nous avons mis 200 cm³ d'eau de mer par Siponcle. Nous avons eu une élimination de 3 mg. 846 d'azote ammoniacal en une heure, et, dans les six heures suivantes, 8 mg. 700. Les Siponcles saignés à ce moment-là ont encore 5 mg. 571 d'azote ammoniacal pour 100 cm³ de sang.

Donc, comme les Maja, les Siponcles éliminent d'autant plus rapidement leur ammoniaque qu'ils ont à leur disposition une plus grande quantité d'eau de mer.

Nous avons essayé de déterminer la dose mortelle d'azote ammoniacal pour les Siponcles, et, pour cela, nous avons refait sur eux la même expérience que nous les Crabes, avec l'urée et l'uréase.

Dans un cristallisoir :

200 cm³ d'eau de mer;
1 gramme d'urée;
5 cm³ de la solution d'uréase à 4 p. 100 dans le phosphate acide de sodium.

Au bout d'une heure un quart, le Siponcle semble mort. L'eau de mer a un pH de 8,4; sa teneur en azote ammoniacal est de 10 mg. 776 pour 100 cm³.

Le Siponcle avait trop peu de sang pour pouvoir faire un dosage d'ammoniaque.

Le Siponcle est un peu moins résistant que le Crabe; à partir de 8 milligrammes, il commence à être malade et il meurt lorsque la dose atteint 10 mg. 776.

CHAPITRE V

PROTOPTERUS ÆTHIOPICUS

Nous consacrerons un chapitre spécial à ce Poisson assez curieux qu'est le *Protopterus æthiopicus* et dont nous avons eu la bonne fortune d'avoir plusieurs exemplaires à notre disposition.

C'est un Poisson dipneuste, donc deux respirations : une aérienne, l'autre aquatique; c'est un terme de passage entre les Poissons et les Batraciens.

Tout d'abord, nous allons donner les quelques renseignements que nous avons pu nous procurer sur son genre de vie.

Le premier lot de ces Poissons a été ramassé dans les rizières desséchées du Ouassoulou, le second lot vient du Lac Télé. Suivant la région, les indigènes l'appellent « Ouon'to » ou « Sina » ou encore « Bonaho ». Cet animal ressemble à une grosse Anguille, avec de petits yeux gris comme sa peau, il possède quatre sortes de longs appendices très mobiles, deux vers la tête, deux vers la queue. Il crie, surtout lorsqu'on le bouscule dans son cocon, ou si on le serre trop fort au col. Son nom indigène de « Ouon'to » semblerait, paraît-il, indiquer la faculté qu'il a de s'enfoncer dans la terre et d'y séjourner pendant la saison sèche. Un peu avant le retrait des eaux, cet animal s'enfonce dans le sol à 20 ou 30 centimètres de profondeur, se replie sur lui-même, mettant sa queue sur sa tête. Il forme alors son cocon mucilagineux en laissant une ouverture au-dessus de son nez et de sa bouche; il peut ainsi avaler les fourmis qui, après le retrait des eaux, s'aventurent par le trou qu'il a fait pour s'enfoncer. En général, il se met dans sa loge en juin-juillet.

pour reprendre sa vie aquatique en septembre-octobre. D'après les habitants, il sort aussitôt la montée du niveau du lac à hauteur de l'orifice supérieur ménagé pour la respiration; l'eau de pluie ou de ruissellement ne provoque pas de changement d'existence tant que le niveau n'est pas influencé à hauteur suffisante. Ce Poisson commet des dégâts sérieux dans les rizières avant l'étiage, coupant les jeunes tiges dont il se nourrit, c'est pourquoi chaque exemplaire trouvé au moment du défrichement est enlevé de sa loge, d'autant plus qu'il est consommé par les cultivateurs, mais ces derniers prennent soin d'enlever les intestins, qui contient un poison violent, ainsi que le cordon cartilagineux qu'ils possèdent à la place de la colonne vertébrale.

Le *Protopterus* est caractérisé par un poumon ouvert du côté ventral de l'œsophage, les branchies sont réduites et impropres à la respiration, de sorte que l'animal a une respiration purement aérienne.

Schmidt, en 1920, a eu l'occasion d'étudier quelques *Protopterus*, et voici les conclusions de son travail : « Durant l'estivation, le poisson est rigidement enfermé dans la boue sèche, il passe à un état de sommeil ou d'inhibition qui semble être d'origine nerveuse causée par l'immobilisation, d'où il est réveillé probablement par asphyxie, quand il est submergé par l'eau...

» Il vit entièrement sans eau et combustible exogène, et la formation d'urine est complètement suspendue dans une atmosphère d'humidité normale...

» Pendant l'estivation, les protéines contribuent à fournir une large part de l'énergie du métabolisme, l'azote protéique total étant presque quantitativement dégradé en urée qui est accumulée dans l'animal jusqu'à 1 ou 2 p. 100 du poids de l'animal en une année. La formation d'ammoniaque est apparemment suspendue. Quand le Poisson revient dans l'eau, l'urée est rapidement excrétée telle que, avec une grande quantité de sulfates...

L'ammoniaque a été déterminée dans l'eau par nesslérisa-

tion directe de 5 à 20 cm³ d'échantillon avec 5 cm³ de solution de Nessler. On complète à 50 cm³. L'urée plus l'azote ammoniacal ont été déterminés par décomposition avec l'uréase et nesslérisation directe. »

Nous avons repris une série d'expériences analogues à celles de Schmidt.

Les *Protopterus* que nous possédions étaient assez petits, ils pesaient environ 50 grammes à leur sortie du cocon.

Expérience I (1er juillet 1935).

Dans un cristallisoir contenant 1.300 cm³ d'eau distillée, nous avons mis deux *Protopterus* sortant de leurs cocons, l'un pesant 20 grammes et l'autre 60. Température, 23° C.

Trente heures après, les poissons étaient sacrifiés, mais, comme ils étaient trop petits, nous n'avons pas pu obtenir de sang. Par contre, l'eau dans laquelle ils ont vécu a été étudiée avec soin, nous y avons dosé l'azote ammoniacal, l'azote hypobromite et l'azote total par les méthodes exposées au chapitre II.

Voici les résultats obtenus ramenés au kilogramme d'animal afin d'avoir des chiffres comparables à ceux de Schmidt.

N (ammoniacal), 37 mg: 53;
N (hypobromite), 568 mg.;
N (total), 390 mg. 50;

$$\text{Rapport } \% \frac{\text{N (ammoniacal)}}{\text{N (total)}} = 6{,}3.$$

Expérience II

Les *Protopterus* sont restés quarante-deux heures dans un cristallisoir contenant 1.000 cm³ d'eau distillée. Les résultats sont donnés par kilogramme d'animal et pour une période de quarante-huit heures :

N (ammoniacal), 51 mg. 58;
N (hypobromite), 294 mg. 73;
N (total), 390 mg. 50;
Rapport % = 13,23.

Dans la première expérience, les deux *Protopterus* venaient de sortir de leurs cocons; aussi, grosse élimination d'urée et rapport : azote ammoniacal/azote total, assez faible.

Dans la deuxième expérience, un des deux *Protopterus* venait de l'expérience précédente et l'autre sortait du cocon, ce qui explique l'augmentation du rapport.

Expérience III.

Dans une série de dosages faits sur le même animal, nous avons pu constater, en effet, une diminution notable de l'urée et une augmentation progressive du rapport azoté.

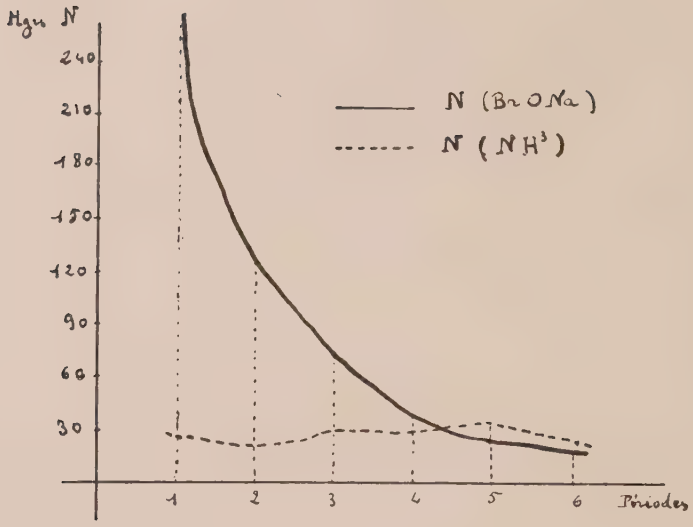
Le 9 juillet, nous avons un *Protopterus* qui venait d'être réveillé. Il est mis dans un cristallisoir avec 500 cm³ d'eau distillée. Son poids est de 45 grammes; tous les deux jours nous avons changé l'eau, de sorte que nous avons pu étudier cette élimination progressive d'urée.

Dans le tableau suivant, nous avons donné les résultats obtenus exprimés en milligrammes par kilogramme d'animal et par période de quarante-huit heures :

DATE	N (NH^3)	N (total)	Rapport p. 100	N (BrONa)
11 juillet.....	29.600	396,82	7.46	378,3
13 juillet.....	25.000	193,23	12.42	126,1
15 juillet.....	30.000	165,00	17,90	78,3
17 juillet.....	29,230	107,52	28,10	43,0
19 juillet.....	31.700	116,96	27.00	31.0
21 juillet.....	26,450	66,66	39,00	20,7

D'après les données de ce tableau, nous avons pu établir les courbes suivantes en mettant en ordonnée le milligramme d'azote ammoniacal et d'azote hypobromite et en abscisse les périodes.

De ce tableau et de ces courbes, il ressort que, à sa sortie du cocon, le *Protopterus* élimine de grosses quantités d'urée, que ce taux d'urée va en s'abaissant alors que le taux d'azote ammoniacal reste sensiblement le même; de sorte que le rapport azote ammoniacal/azote total va en augmentant.



Nous pouvons donc conclure, comme Schmidt, que les protéines doivent fournir une grande part de l'énergie du métabolisme, l'azote protéique étant presque quantitativement transformé en urée, qui est accumulée dans l'animal. Lorsque le Poisson reprend sa vie aquatique, il rejette cette urée et reprend le régime des Poissons, c'est-à-dire à élimination ammoniacale.

Expérience IV.

Au mois d'octobre-novembre, nous avons remis en expérience un *Protopterus* de 50 grammes et nous avons étudié de nouveau son élimination en vingt-quatre heures. Nous avons obtenu les chiffres suivants, rapportés au kilogramme d'animal :

Première période de vingt-quatre heures, 362 mg. 72;
Deuxième période de vingt-quatre heures, 423 mg. 20;
Troisième période de vingt-quatre heures, 166 mg. 64;
Quatrième période de vingt-quatre heures, 90 mg. 68;
Cinquième période de vingt-quatre heures, 53 mg. 00,

Nous obtenons toujours dans le premier temps beaucoup d'urée, puis cette quantité va sans cesse en s'abaissant. Il est à remarquer que ces résultats sont plus élevés que ceux de juillet, ce qui tient à ce que le *Protopterus* est resté quatre mois de plus en estivation. Schmidt, qui a laissé des Poissons plus d'un an dans leur cocon a trouvé des chiffres encore plus élevés : 1.970 mg., 1.650 mg.

Ce même *Protopterus* a été laissé plusieurs jours dans un grand cristallisoir avec suffisamment d'eau pour qu'il s'épure complètement et qu'il reprenne son régime aquatique normal. Cinq jours après, nous l'avons mis dans un cristallisoir avec une quantité déterminée d'eau distillée (200 cm³) et nous avons de nouveau étudié, pendant quelques jours, son élimination d'urée et d'ammoniaque.

Voici nos résultats exprimés en milligrammes par vingt-quatre heures et par kilogramme d'animal :

Date	Azote ammoniacal	Azote hypobromite
20 novembre	5.00	18.96
21 novembre	7.40	28.66
22 novembre	8.00	23,92
23 novembre	5.54	19,12

Nos expériences confirment en tout point celles de Schmidt : le *Protropterus* présente une azotémie assez forte pendant sa période d'estivation parce qu'il lui est impossible d'éliminer son urée; il vit en vase clos, mais cette azotémie transitoire cesse dès que l'animal a repris sa vie aquatique qui est à excrétion azotée à prédominance ammoniacale, comme celle de l'ensemble de Poissons.

Résistance du *Protopterus* à l'ammoniaque.

Dans une deuxième série d'expériences, nous avons cherché le taux d'élimination d'ammoniaque, après injection de sels ammoniacaux, ainsi que la dose toxique. A notre connaissance, aucun travail n'a été publié sur ce sujet.

Expérience I.

En novembre 1935, nous avons sorti de leurs cocons deux *Protopterus* que nous avions reçus au mois de juin. Ils pesaient 50 grammes chacun.

Débarrassés de leurs cocons, nous les avons mis dans de l'eau ordinaire pour qu'ils reprennent leur vie aquatique. Puis nous les avons laissés tous les deux dix-neuf heures dans un grand cristallisoir contenant 1.200 cm³ d'eau. Le lendemain, nous en avons injecté avec 0 cm³,5 d'une solution de $ClNH^4$, dont 1 cm³ correspond à 10 milligrammes d'azote ammoniacal. L'animal étant placé sur le dos, on enfonce l'aiguille au niveau des appendices antérieurs, de façon à faire l'injection dans la cavité péritonéale. Nous appellerons A ce *Protopterus* qui est mis dans un récipient avec 200 cm³ d'eau ordinaire. L'autre *Protopterus* A', non injecté, mis dans les mêmes conditions, servira de témoin.

Dans le tableau suivant, nous donnons parallèlement les chiffres d'azote hypobromite et d'azote ammoniacal pour les deux *Protopterus*. Après chaque prélèvement, nous avons remplacé la totalité de l'eau dans les deux cristallisoirs par de l'eau ordinaire sans ammoniaque.

Période	Azote hypobromite		Azote ammoniacal	
	A	A'	A	A'
5 heures.....	—	—	0,800	0,500
19 heures.....	41,560	18,136	1,000	0,600
24 heures.....	30,228	21,160	0,600	0,600
24 heures.....	11,365	8,327	0,666	0,588
24 heures.....	7,557	4,534	0,600	0,579
72 heures.....	5,368	2,650	—	—

Nos résultats sont exprimés en milligrammes pour la totalité de l'eau dans laquelle a vécu le *Protopterus*. Si nous considérons ce tableau, nous voyons que l'élimination de l'urée est encore augmentée par suite de l'injection de chlorhydrate d'ammoniaque, alors que nous voyons peu d'ammoniaque excrétée en supplément.

Expérience II.

Dans une autre expérience, nous avons étudié l'élimination de l'ammoniaque sur des Poissons qui étaient adaptés à la vie aquatique depuis quelque temps.

Nous avons toujours pris deux *protopterus*, afin d'avoir un témoin soumis aux mêmes conditions. Ces deux animaux étaient sortis de leurs cocons déjà depuis quinze jours lorsque nous les avons mis en expérience. L'un et l'autre sont mis dans des cristallisoirs différents avec 250 cm³ d'eau; nous les y laissons vingt-quatre heures et recueillons cette eau, et nous y dosons l'azote ammoniacal et l'azote hypobromite.

Appelons B et B' ces deux *protopterus*.

Azote ammoniacal en mg. pour la totalité de l'eau :

B = 0,370;
B' = 0,250.

Azote hypobromite en mg. pour la totalité de l'eau :

B = 1,656;
B' = 0,946.

Nous voyons que ces deux animaux se comportent de façon tout à fait normale.

Le *Protopterus* B est alors injecté avec 5 milligrammes d'azote ammoniacal. Pendant les deux premières heures qui suivent l'injection, il paraît un peu excité; puis il se calme et vit normalement pendant plusieurs jours. Dans le tableau suivant, nous donnons les résultats trouvés pour les périodes de vingt-quatre heures consécutives :

Période	Azote hypobromite		Azote ammoniacal	
	B	B'	B	B'
—	1.656	0.946	0.370	0.250
1	3.900	1.433	3.822	0.370
2	1.674	1.496	0.833	0.400
3	2.063	0.956	—	0.277
4	1.865	—	0.500	0.250

Le *Protopterus* B a donc éliminé la plus grande partie de l'ammoniaque injectée dans la première période de vingt-quatre heures. Ce fait est commun à tous les Invertébrés étudiés précédemment. Il y a élimination très rapide du toxique.

Expériences III et IV.

Deux autres expériences furent faites sur des poissons qui avaient été ramenés à la vie aquatique depuis plus de vingt jours. L'injection a été de 10 milligrammes d'azote ammoniacal à chacun. Cette dose est assez forte pour les petits *Protopterus* que nous avions, car, aussitôt après l'injection, ils sont très excités, avec des contractions violentes pendant plusieurs heures.

Dans le tableau suivant, nous avons consigné les différents résultats d'azote ammoniacal et d'azote hypobromite trouvés chez les Poissons C et D :

Période	Azote hypobromite		Azote ammoniacal	
	C	D	C	D
6 heures.....	2.410	—	2.280	2.877
24 heures.....	3.855	3.407	3.000	3.125
24 heures.....	1.437	1.963	1.136	1.666
24 heures.....	1.200	1.227	0.400	0.694

Ce tableau confirme le précédent. Il y a une forte élimination d'ammoniaque dans les vingt-quatre heures qui suivent l'injection.

Nous retrouvons donc pour le *Protopterus* ce que nous avons déjà trouvé pour les Invertébrés intoxiqués par l'ammoniaque.

CONCLUSIONS

Ces recherches ont eu pour but, en utilisant une méthode éprouvée et que nous avons adaptée à nos travaux, de déterminer de la façon la plus précise le taux d'azote ammoniacal normal dans le milieu intérieur d'un certain nombre d'Invertébrés et de quelques Poissons. Nous avons, en outre, étudié l'excrétion de cet azote ammoniacal dans des conditions normales d'existence, c'est-à-dire de celui produit par la désintégration des protides apportés par l'alimentation ou de ceux déjà formés dans l'organisme et que celui-ci utilise pour les besoins de son activité cellulaire. Enfin, par l'introduction dans le milieu intérieur de ces animaux de solutions de sels ammoniacaux, nous avons voulu nous rendre compte de quelle façon ils réagissaient et si, par un processus que l'on ne peut mettre en évidence dans leurs conditions habituelles d'existence, ils étaient capables de le détruire ou de le transformer en composés moins toxiques ou insolubles.

Comme H. Delaunay, nous arrivons à ce fait important que l'excrétion ammoniacale représente l'excrétion azotée basale, car elle se retrouve chez tous les Invertébrés et Vertébrés inférieurs, de même que nous la trouvons au début du développement embryonnaire. Il n'était donc pas exact de considérer, comme on l'a fait, l'urée et l'acide urique comme les deux principaux déchets azotés, bien qu'ils soient la forme de l'excrétion chez les Vertébrés (prépondérance chez les Mammifères, et prépondérance de l'acide urique chez les Oiseaux et les Reptiles). A la bas se trouve toujours l'ammoniaque libéré par les protides; l'uréogénèse et l'urico-

génèse évitent l'accumulation de corps ammoniacaux toxiques pour l'organisme.

D'autre part, il ressort de notre étude que, chez les Invertébrés qui vivent dans l'eau, l'excrétion ammoniacale est forte, ils n'ont pas besoin de transformer les corps ammoniacaux en substances moins toxiques, comme l'urée, ou insoluble, comme l'acide urique. Nous avons vu, en effet, dans le chapitre des Intoxications, que lorsque l'on injecte des sels ammoniacaux à des Crustacés, des Gastéropodes ou même des Vers, tous tendaient à l'éliminer le plus rapidement possible, puisque nous retrouvons dans le milieu extérieur la totalité de l'ammoniaque injectée. La vitesse d'élimination est fonction de la non-saturation de l'eau en ammoniaque. Mais lorsque le taux de cette substance dans le sang ou dans le liquide cavitaire devient trop fort et sans qu'il puisse y avoir élimination, l'animal ne résiste pas, car il ne peut pas transformer l'ammoniaque en urée ou acide urique, ou l'utiliser comme aliment à la façon des végétaux.

De plus, nous avons vu dans le chapitre IV que la toxicité de l'ammoniaque était fonction non seulement de sa concentration dans le milieu intérieur, mais encore fonction de l'alcalinité du milieu dans lequel vivent les animaux. En effet, au fur et à mesure qu'augmente le p (H) la toxicité ammoniacale croît

Enfin, si dans cette thèse nous avons étudié quelques Poissons et surtout le *Protopterus*, c'est qu'il nous a semblé utile de montrer que le type de l'élimination azotée n'est pas en rapport avec la Classification zoologique, mais qu'elle dépend surtout du genre d'existence des animaux. Le *Protopterus* avait pour nous l'avantage, ayant une excrétion uréique, d'être forcé par les circonstances vitales de sortir de son milieu aquatique. Il conserve ses déchets pendant sa vie ralentie, puisqu'il vit sans échange azoté avec l'extérieur. La façon dont il reprend son existence normale et l'étude des modifications importantes de son excrétion à ce

moment nous ont permis de déterminer les relations pouvant exister entre les deux types principaux de l'élimination de l'azote de déchet. Nous pouvons dire que tout animal vivant dans un milieu aquatique, et tous les êtres vivants passent au moins par ce stade pendant leur vie embryonnaire, a une excrétion fondamentale du type ammoniacal.

Vu : *Le Doyen*,
PIERRE MAURIAC.

Vu, bon a imprimer :
Le Président,
L. CHELLE.

Vu et permis d'imprimer :
Bordeaux, le 20 juillet 1937.
Le Recteur de l'Académie,
A. TERRACHER.

BIBLIOGRAPHIE

Baglioni. — Einige Daten zur Kenntnis der quantitativen Zuzammensetzung verschiedener Körperflüssikeiten von Seetiere. *Beitz. z. chem. Physiol. u. Pathol.*, 9, 1906.

Bialaszewicz. — Sur la régulation de la composition minérale de l'hémolymphe chez le Crabe. *Arch. int. de physiol.*, 35, 1932.

Bohn. — De l'importance de l'ammoniaque comme facteur éthologique. *C. R. de la Soc. de biol.*, 11e série, I, 1899.

Boivin. — Contribution à l'étude de la sécrétion urinaire chez les Crustacés décapodes. *C. R. de la Soc. de biol.*, 102, 1929.

Braconnier. — Recherches biochimiques sur l'excrétion de la sangsue. Thèse doct. pharm. Bordeaux, 1932-1933.

Burian. — Die Excretion ; Protozoen, Cölenteraten, Echinodermen Würmer. *Handbuch der vergleichenden Physiologie*, 2, 2 Hälfte, 1924.

Burian (R.) et Muth (A.). — Die Excretion ; Crustceen. *Ibid.*

Cohnheim (O.). — Versuche über Resorption, Verdanung und Stoffwechsel von Echinodermon. *Z. f. Physiol. Chemie.*, 33, 1921.

Couvreur (E.). — Note sur le sang de l'Escargot. *C. R. de la Soc. de biol.*, t. 52, 1900.

Cox (J.), Briggs et Hudson (L.). — The determination of ammonia by aeration. *J. Labor. clin. méd.*, 1928. 14, 159-161.

Cuenot (L.). — Etudes physiologiques sur les Astéries, *Arch. de zool. expér. et gén.*, 3e série, t. 9, 1901.

— Contributions à la faune du bassin d'Arcachon, Echinodermes. *Bull. de la Stat. biol. d'Arcachon*, t. 14, 1911-1912.

Cuenot (L.). — Etudes physiologiques sur les Crustacés décapodes. *Arch. de biol.*, t. 13, 1894.

— L'excrétion chez les Mollusques. *Arch. de biol.*, t. 16, 1900.

Delaunay (H.). — Recherches sur les échanges azotés des Invertébrés. *Arch. int. de physiol.*, t. 13, 1913.

— Sur quelques faits particuliers à la répartition de l'azote dans le liquide cavitaire des Vers (*Aphrodite aculeata*, *Sipunculus nudus*). *C. R. de la Soc. de biol.*, t. 74, 1913.

— Sur l'excrétion azotée des Astéries (*Asterias rubens*). *C. R. de la Soc. de biol.*, t. 94, 1926.

— Sur l'excrétion azotée de la Seiche. *Ibid.*

— Recherches biochimiques sur l'excrétion azotée des Invertébrés. Thèse sc. nat., déc., Paris, et *Bull. de la Stat. biol. d'Arcachon*, 21, 23 et 24, 1927.

— L'excrétion azotée des Invertébrés. *Biological Reviews*, 6, 1931.

— Le métabolisme de l'ammoniaque d'après les recherches relatives aux Invertébrés. *Ann. de physiol.*, t. X, 4, 1934.

Duval (M.). — Recherches physico-chimiques et physiologiques sur le milieu intérieur des animaux aquatiques. Modifications sous l'influence du milieu extérieur. *Annales de l'Institut Océanographique*, t. 2, fasc. III.

Fischer (E.). — Recherches histologiques et histo-physiologiques sur l'appareil excréteur des Crustacés décapodes. *Mém. de la Faculté des sc. de Paris*, 262, 1925.

Fleury (P.). — Appareil pour le dosage rapide de l'ammoniaque urinaire par la méthode « à la cloche » de Schloesing.

Flury. — Zur Chemie und Toxicologie der Ascariden. *Arch. f. exp. Pathol. u. Pharm.*, 67, 1912.

Folin (O.). — The determination of ammonia in blood and other biological Fluids. *J. biol. chem.*, 97, 1932.

Fontès (G.) et Yovanovitch (A.). — Existe-t-il des sels ammoniacaux dans le sang *Bull. de la Soc. de chim. biol.*, t. 8, 1925.

Futh (O.). — Ueber den Stoff Wechsel der Céphalopoden. *Zeit. f. Physiol. Chem.*, 31, 1900.

Golse (J.). — Dosage volumétrique de l'ammoniaque dans les eaux. *Bull. de la Soc. de pharm. de Bordeaux*, 1925.

Hesse (O.). — Zum Hungerstoffwecuel der Weinberschnecke. *Z. f. allg. Phys.*, 10, 1910.

Heyde (H. C. Van der). — Petites contributions à la physiologie comparée, IV. Sur l'excrétion des Echinodermes. *Arch. néerland. de physiol.*, t. 8, 1923.

Hugounencq (L.) et Florence (G.). — Expérience de cours se rapportant à l'azotémie. *Bull. de la Soc. de biol.*, t. III, 1921.

Koch (F. C.) et Mc Meekin (T. L.). — A new direct Nesslerisation micro Kjeldahl method and a modification of the Nessler-Folin reagent. *J. Am. Chem. Soc.*, 46, 2006, 1924.

Lesser (E.). — Chemische Prozessebei Regenwürmern. *Z. f. Biol.*, 50, 1908.

Lindemann (W.). — Urämie bie Cephalopoden. *Zieger's Beitr. z. Pathol. anat. u. allg. Pathol.*, 27, 1900.

Marchal (P.). — Recherches anatomiques et physiologiques sur l'appareil excréteur des Crustacés décapodes. *Arch. zool. exp. et gén.*, série 2, 10, 1892.

Moissonier (J.). — Etude sur la toxicité des sels ammoniacaux et du mécanisme de leur action thérapeutique. Thèse Faculté de médecine de Paris, 1921.

Mollitor (A.). — Beiträge zur Untersuchung des Exkretstoffwechsel und der Exkretion von Eriocheir sinensis. *Abteil. f. allg. Zool. u. Physiol. d. T.*, 1937.

Morgulis (S.). — The effect of injection of various substances upon the blood composition of the tortugas crawfish (*Palinurus argus*). *J. Biol. Chem.*, 55, 1923.

Myers (O. G.). — Blood of Invertebrates. *J. Biol. Chem*,. 41, 1920.

Nash et Bénédict. — The ammonia content of the blood and its bearing on the mechanism of acid neutralisation in the animal organism. *J. Biol. Chem.*, 48, 1921.

Parnas (J.-K.). — Existe-t-il des sels ammoniacaux dans le sang circulant ? *Bull. de la Soc. de chim. biol.*, 9, 1927.

Przylecki (St. J.). — L'excrétion ammoniacale chez les Invertébrés dans les conditions normales et expérimentales. *Arch. int. de physiol.*, 20, 1908.

Puter (A.). — Der Stoffwechsel des Blutegels (*Hirudo officinalis*). *Z. f. allg. Physiol.*, 6, 7, 1907.

Richet (C.). — Dictionnaire de physiologie.

Rodier (E.). — Observations et expériences comparatives sur l'eau de mer, le sang et les liquides internes des animaux marins. *Bull. de la Stat. zool. d'Arcachon*, t. 3, 1899.

Smith (H. W.). — Metabolism of the lungfish (*Protopterus ethiopicus*). *J. Biol. Chem.*, 38, 1930.

— The excretion of ammonia and urea by the gills of Fisch. *J. Biol. Chem.*, 81. The composition of the body fluids of Elasmobranchs. *Ibid.*, 81, 1929.

Souterbicq (Mme J.). — Sur le taux de l'ammoniaque dans les liquides du milieu intérieur de quelques Invertébrés. *C. R. de Soc. biol. de Bordeaux*, t. CXX, u. 453, 1935.

Strohl (J.). — Die Excretion : Mollusken. Handduch der Vergleichendeb Physiologie, 2, 2 Hülfte, 1924.

Teorell (T.). — Eine neue Methode zur Titrimetrischen Bestimung kleinster Mengen Ammonia k. Biol. *Z. f. Biol.*, 248, 1932.

Van Slyke. —

Weinland (E.). — Ueber die Ausscheidung von Ammoniak durch Die Larven von Kalliphora und über eine Bezichung dieser Tatsach zu dem Entwicklungstadium dieser tiere. *Z. f. Biol.*, 47, 1905.

— Ueber die Zersetzung der Stickstoffhaltigen Substanz bei Ascaris. *Z. f. Biol.*, 42, 1901.

Wolff (G.). — Die physiologische Chemie der nephridialen Stickstoffausscheidung bei *Helix pomatia* L., unter besonderer Berücksichtigung der Einflüsse des Sommer und Winterstoffwechsel. *Zeitsch. f. vergleich. Physiol.*, 19, 1933.

20345. — Bordeaux, Impr. Centrale Delmas, 6, pl. St-Christoly. — 1937.